

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS DE  
ESPECIFICIDAD DUAL (DUSP2 Y DUSP6) POR  
RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS EN NEURONAS  
GRANULARES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Verónica Morente Rodríguez**

Bajo la dirección de las doctoras

María Teresa Miras Portugal  
Raquel Pérez Sen

**Madrid, 2013**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Regulación de las proteínas fosfatasa de especificidad dual (DUSP2 y DUSP6) por receptores de nucleótidos en neuronas granulares

TESIS DOCTORAL

Verónica Morente Rodríguez  
Madrid, 2013



**Dra. Raquel Pérez Sen**, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y la **Dra. M<sup>a</sup> Teresa Miras Portugal**, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que **Verónica Morente Rodríguez**, licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado “Regulación de las proteínas fosfatasa de especificidad dual (DUSP2 y DUSP6) por receptores de nucleótidos en neuronas granulares” como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Junio de 2013

**VºBº DIRECTORES**

Dra. María Teresa Miras Portugal

Dra. Raquel Pérez Sen

La doctoranda:

Verónica Morente Rodríguez



La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral para la formación de personal investigador del Ministerio de Economía y Competitividad. Asimismo, ha contado con la financiación de los proyectos BFU2008-02699/BFI, BFU 2011-24743, la Fundación Marcelino Botín, MEyC Consolider-Ingenio CSD2008\_00005.

## ABREVIATURAS

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b>	Concentración intracelular de calcio ([Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> )
<b>2MeSADP</b>	2-Metil-tio-adenosina-5'-difosfato
<b>2MeSAMP</b>	2-Metil-tio-adenosina-5'-monofosfato
<b>2MeSATP</b>	2-Metil-tio-adenosina-5'-trifosfato
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ABC</b>	ATP binding cassette
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADP</b>	Adenosina 5'-difosfato
<b>AMP</b>	Adenosina 5'-monofosfato
<b>AMPA</b>	Ácido- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisozazol- 4-propiónico
<b>AMPc</b>	Adenosina-5'-monofosfato cíclico
<b>Ap<sub>4</sub>A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>4</sup> -Di(adenosina-5')tetrafosfato
<b>Ap<sub>5</sub>A</b>	P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> -Di(adenosina-5')pentafofosfato
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato
<b>BBG</b>	Brilliant Blue G
<b>BCI</b>	<i>E</i> -2-Benziliden-3-(ciclohexilamino)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona
<b>BDNF</b>	Factor neutral derivado del cerebro
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>BzATP</b>	3'-O-(4-benzoil)benzoil adenosine-5'-trifosfato
<b>CaMK II</b>	Ca <sup>2+</sup> -calmodulina quinasa II
<b>CD</b>	Dominio común
<b>CKII</b>	Quinasa de caseína II
<b>CREB</b>	Elemento de unión de respuesta a AMPc
<b>CTP</b>	Citosina 5'-trifosfato
<b>Cy3</b>	Cianina tipo 3
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DIV</b>	Días <i>in vitro</i>
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DUSP</b>	Proteína fosfatasa de especificidad dual
<b>EBSS</b>	Del inglés: Earle's Balanced Salt Solution
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo
<b>EDTA</b>	Ácido etilén-diamino tetraacético
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor de EGF
<b>EGTA</b>	Ácido etilé-bis(oxonitrilo)-tetraacético
<b>EMSA</b>	Ensayo de cambio en el desplazamiento por electroforesis
<b>E-NPPasa</b>	Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas

<b>E-NTPDasa</b>	Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señalización extracelular
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>Fura-2 AM</b>	Fura-2 acetoximetil éster
<b>GABA</b>	Ácido-g-aminobutírico
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar ácida
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GMPc</b>	Guanosina-5'-monofosfato cíclico
<b>GPRC</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>GSK3</b>	Glucógeno sintasa quinasa 3
<b>GTP</b>	Guanosina 5'-trifosfato
<b>GTP</b>	Guanosina 5'-trifosfato
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>HEPES</b>	Ácido 2-[4-(2-hidroietil)-1-piperacil-(1)]-etanosulfónico
<b>HePTP</b>	Proteína tirosina fosfatasa hematopoyética
<b>HM</b>	Motivo hidrofóbico
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración de inhibidor que produce el 50% del efecto máximo
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>JNK</b>	Quinasa de c-Jun en N-terminal
<b>JNK</b>	Quinasas c-Jun N-terminal
<b>KIM</b>	Dominio de interacción de quinasas
<b>KO</b>	Knock out
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>MAPKK</b>	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
<b>MAPKKK</b>	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógenos
<b>miARN</b>	micro ARN
<b>MKB</b>	Dominio de unión a MAPK
<b>MKP</b>	Proteína fosfatasa específica de MAP quinasas
<b>MRS-2179</b>	2'-deoxy-N6-metiladenosina-3'-5'-bifosfato
<b>MRS-2211</b>	6-(2'-cloro-5'-nitro-azofenil)-piridoxal- $\alpha$ -5-fosfato
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio
<b>Nf-kB</b>	Factor nuclear-kb
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento neural
<b>NMDA</b>	Ácido N-metil-D-aspartico
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>p38-MAPK</b>	MAP quinasa p38
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDK-1</b>	Quinasa dependiente de fosoinositol-1
<b>PEST</b>	Secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina
<b>PFA</b>	<i>p</i> -formaldeído
<b>P<sub>i</sub></b>	Fosfato inorgánico
<b>PI3-K</b>	Fosfatidilinositol-3-quinasa
<b>PKB</b>	Proteína quinasa B (Akt)

<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PKD</b>	Proteína quinasa D
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PP1/PP2/PP2A/PP2C</b>	Proteína fosfatasas 1, 2, 2A y 2C
<b>PPADS</b>	Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-ácido disulfónico
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PSP</b>	Proteína serina/treonina fosfatasa
<b>PTEN</b>	Proteína fosfatasa homóloga a la tensina
<b>PTP</b>	Proteína tirosina fosfatasa
<b>PTP SH-2</b>	Proteína tirosina fosfatasa con dominios SH-2
<b>Q-PCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RTK</b>	Receptor tirosina quinasa
<b>RT-PCR</b>	PCR por retrotranscripción
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>SH2</b>	Dominios de homología Src 2
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>Src</b>	Proteína quinasa del retrovirus del sarcoma de Rous
<b>STEP</b>	Proteína fosfatasa enriquecida del estriado
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>UDP</b>	Uridina 5'-difosfato
<b>UTP</b>	Uridina 5'-O-(3-tiotridifosfato)
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>VNUT</b>	Transportador vesicular de nucleótidos
<b>WB</b>	Western Blot
<b><math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-meATP</b>	$\alpha$ , $\beta$ -metilen-adenosina-5'-trifosfato
<b>WB</b>	Western Blot
<b><math>\alpha</math>, <math>\beta</math>-meATP</b>	$\alpha$ , $\beta$ -metilen-adenosina-5'-trifosfato



# ÍNDICE

<b>SUMMARY</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>1. EL SISTEMA PURINÉRGICO</b> .....	17
1.1. Los nucleótidos en la neurotransmisión .....	17
1.2. Almacenamiento, liberación y degradación de nucleótidos .....	18
1.3. Receptores de adenosina .....	24
1.4. Receptores de nucleótidos .....	24
1.4.1. Receptores metabotrópicos P2Y .....	25
1.4.1.1. Estructura de los receptores P2Y .....	26
1.4.1.2. Señalización intracelular mediada por receptores P2Y .....	30
1.4.1.3. Características farmacológicas. Distribución de los receptores P2Y en el sistema nervioso .....	31
1.4.1.4. Receptor metabotrópico P2Y <sub>13</sub> .....	31
1.4.1.4.a) Características farmacológicas del receptor P2Y <sub>13</sub> .....	32
1.4.1.4.b) Funciones fisiológicas del receptor P2Y <sub>13</sub> .....	32
1.4.1.4.c) Señalización del receptor P2Y <sub>13</sub> en neuronas granulares de cerebelo. Implicación en neuroprotección y neurodegeneración. ....	33
1.4.2. Receptores ionotrópicos P2X7 .....	35
1.4.2.1. Características estructurales y oligomerización.....	36
1.4.2.2. Características funcionales y regulación de los receptores P2X.....	39
1.4.2.3. Características farmacológicas.....	41
1.4.2.4. Receptor ionotrópico P2X7 .....	42
1.4.2.4.a) Características farmacológicas del receptor P2X7 .....	44
1.4.2.4.b) Señalización del receptor P2X7 .....	45
1.4.2.4.c) El receptor P2X7 en el sistema nervioso y su función neuronal. Implicaciones en neuroprotección y neurodegeneración .....	46

<b>2. EL CEREBELO .....</b>	<b>50</b>
2.1. Anatomía del cerebelo .....	50
2.2. Histología y citoarquitectura del cerebelo .....	51
2.3. Circuito neuronal cerebeloso, vías aferentes y eferentes .....	54
2.4. Avances en el conocimiento de las funciones del cerebelo .....	55
2.5. La neurona granular en el cerebelo .....	55
2.5.1. La neurona granular de cerebelo en cultivo .....	56
<b>3. PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS .....</b>	<b>58</b>
3.1. Proteínas ERK1/2 (Quinasas reguladas por señalización extracelular) .....	58
3.2. Proteínas JNK (Quinasas c-Jun N-terminal) .....	59
3.1. Proteínas p38-MAPK (MAP quinasas p38) .....	59
<b>4. PROTEÍNAS FOSFATASAS .....</b>	<b>61</b>
4.1. Proteínas serina/treonina fosfatasas (PSPs) .....	61
4.2. Proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) .....	62
4.2.1. PTPs clásicas .....	64
4.2.2. Fosfatasas de especificidad dual (DUSPs) .....	64
4.2.2. Fosfatasas específicas de MAP quinasas (MKPs) .....	66
4.2.2.1.a) Clasificación de MKPs .....	69
4.2.2.1.b) Regulación de las MKPs .....	70
4.2.2.1.c) MKPs y patologías .....	73
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
<b>1. MATERIAL .....</b>	<b>85</b>
1.1. Material biológico .....	85
1.2. Instrumentación .....	85
1.3. Reactivos .....	87
<b>2. MÉTODOS .....</b>	<b>90</b>
2.1. Obtención y cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata .....	90
2.2. Estudios de expresión génica .....	93
2.2.1. Obtención de muestras .....	93

2.2.2. Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído	93
2.2.3. Reacción de la transcriptasa inversa (RT) y reacción de cadena de la polimerasa (PCR).....	94
2.2.4. Amplificación por PCR a tiempo real (PCR cuantitativa en tiempo real) ..	95
2.3. Inmunotransferencia.....	99
2.3.1. Extracción de proteínas totales.....	99
2.3.2. Cuantificación de proteínas .....	99
2.3.3. Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de membranas.....	100
2.4. Inmunocitoquímica.....	101
2.5. Tratamiento de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo .....	102
2.6. Ensayo de viabilidad celular basado en el metabolismo del MTT.....	103
2.7. Análisis estadístico de los datos.....	104
<b>RESULTADOS</b> .....	105
<b>1. NEUROPROTECCIÓN MEDIADA POR LOS RECEPTORES P2Y<sub>13</sub> Y P2X<sub>7</sub> FRENTE A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y CAMPTOTECINA EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO</b> .....	107
1.1. Efecto de la radiación UV y la camptotecina en neuronas granulares de cerebelo	108
1.2. Papel protector de los receptores de nucleótidos P2Y <sub>13</sub> y P2X <sub>7</sub> frente a la apoptosis inducida por radiación UV y camptotecina .....	109
1.3. Activación sostenida de las proteínas ERK1/2-MAP quinasas tras la exposición a la radiación UV y camptotecina. Efecto de los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y BzATP .....	111
<b>2. REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA FOSFATASA DE ESPECIFICIDAD DUAL DUSP2, POR EL RECEPTOR NUCLEOTÍDICO P2Y<sub>13</sub> EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO</b> .....	115
2.1. Efecto de la droga citotóxica cisplatino sobre la señalización de las proteínas MAP quinasas en neuronas granulares.....	115
2.2. Efecto del agonista nucleotídico del P2Y <sub>13</sub> , 2MeSADP, sobre la activación sostenida de las proteínas ERK1/2 y p38-MAPK inducida por cisplatino.....	116
2.3. Efecto del 2MeSADP sobre la activación sostenida de las proteínas MAP quinasas inducida por la radiación UV .....	121
2.4. Análisis de la expresión de la proteína fosfatasa DUSP2 en neuronas granulares expuestas al cisplatino y a la radiación UV .....	122



2.5. Expresión de la proteína fosfatasa DUSP2 mediada por el agonista nucleotídico 2MeSADP .....	124
2.6. Efecto neuroprotector del receptor P2Y <sub>13</sub> frente a la apoptosis inducida por cisplatino y radiación UV .....	127
<b>3. REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA FOSFATASA DE ESPECIFICIDAD DUAL DUSP6, POR EL RECEPTOR NUCLEOTÍDICO P2X7 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.....</b>	<b>129</b>
3.1. Efecto del agonista nucleotídico del receptor P2X7, BzATP, sobre la activación sostenida de las proteínas ERK1/2 inducida por cisplatino en neuronas granulares de cerebelo.....	129
3.2. Análisis de la expresión de la proteína fosfatasa DUSP6 en neuronas granulares expuestas al cisplatino.....	132
3.3. Expresión de la proteína fosfatasa DUSP6 inducida por BzATP y EGF .....	134
3.4. Efecto neuroprotector mediado por el BzATP frente a la apoptosis inducida por el cisplatino .....	140
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
<b>1. INDUCCIÓN DE ESTRÉS GENOTÓXICO EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO .....</b>	<b>145</b>
<b>2. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE LA ACTIVACIÓN DE LAS MAP QUINASAS POR ESTRÉS GENOTÓXICO .....</b>	<b>147</b>
<b>3. REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS DE ESPECIFICIDAD DUAL POR RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS .....</b>	<b>149</b>
3.1. El receptor nucleotídico P2Y <sub>13</sub> en la regulación de la actividad y expresión de la proteína fosfatasa DUSP2.....	152
3.2. El receptor nucleotídico P2X7 en la regulación de la actividad y expresión de la proteína fosfatasa DUSP6.....	155
<b>4. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DEL MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD DE LAS FOSFATASAS DE ESPECIFICIDAD DUAL EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR .....</b>	<b>162</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>167</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>171</b>

## *Summary*





## INTRODUCTION.

Many of the functions of the extracellular nucleotides are well-documented in numerous and various areas of the brain, and they affect both glial and neuronal cells (Burnstock, 2007; Abbracchio *et al.*, 2009). Moreover, nucleotides can also participate in long term processes in neurons, such as differentiation, neurite growth and survival, in addition to intervening in pathological processes such as ischemia, neurodegenerative diseases or cerebral trauma (Burnstock, 2007, 2008).

The biological effects of the nucleotides are mediated by the purinergic receptors that can easily be categorized into two groups: P1 receptors (selective for adenosine) and P2 receptors (selective for ATP, ADP, UTP and UDP, which act as extracellular signalling molecules) (Burnstock, 1978). P2 receptors are classified into two families: ionotropics (P2X1-7) (Surprenant A, 2008) and metabotropics (P2Y<sub>1,2,4,6,11-14</sub>) (Abbracchio *et al.*, 2006). Degradation of the nucleotides for ectonucleotidases plays a fundamental and pivotal role in the regulation of the extracellular concentrations of nucleotides and therefore, regulate nucleotide functions at the central nervous system (CNS) (Zimmermann, 2006).

Cerebellar granular neurons, due to their postnatal development and viability in culture, represent an excellent model for the study of the neuronal function and pathology, including survival/apoptosis signalling cascades and neuroprotection mechanisms (Contestabile, 2002). These cells exhibit a wide variety of both ionotropic and metabotropic purinergic receptors, which have characterized in previous work to understand their signaling and physiological function in this neuronal model (Hervas *et al.*, 2003; Cavaliere *et al.*, 2004).

Our group has described the signaling pathways triggered by P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptors in cerebellar granular neurons. The P2Y<sub>13</sub> receptor is coupled to GSK3 phosphorylation and inhibition of its catalytic activity through the canonical PI3K/Akt dependent route, allowing the stabilization and nuclear translocation of the transcriptional regulator,  $\beta$ -catenin, which is involved in survival processes. In the same extent, P2X7 activation also couples to GSK3 inhibition through different pathway that was PKC-dependent exhibiting survival promoting effects (Ortega *et al.*, 2008; Ortega *et al.*, 2009). Furthermore, P2X7 receptors cooperated with BDNF and NMDA receptors in GSK3 signalling through a PKC-dependent way and neuroprotection against the apoptotic outcome of PI3K inhibition (Ortega *et al.*, 2010).

On the other hand, both types of nucleotide receptors also activate ERK1/2-MAP kinase signaling through different mechanisms, which were PI3K and CaMKII dependent for P2Y<sub>13</sub> and P2X7, respectively. The signaling towards ERK1/2 signaling was responsible for their neuroprotective effect against apoptosis induced by excitotoxic glutamate concentrations (Ortega *et al.*, 2011).

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) are crucial and critical components of complex intracellular signaling cascades that regulate gene expression in response to a wide variety of extracellular stimuli. In eukaryotic cells, multiple routes of MAPKs can regulate cellular processes as important as the cellular growth, proliferation, differentiation, and apoptosis. Among the families of MAPKs family, the ERK1/2 proteins are activated by mitogens and growth factors. In addition, stress and inflammatory stimuli constitute the main effectors activating the stress-related kinases, JNK and p38-MAPK. Taking into account their relevance in cellular functions, the deregulation of MAPK activity is involved in different pathological processes, such as inflammation, oncogenic transformation and tumor invasion (Junttila *et al.*, 2008).

The reversible phosphorylation of the MAPK proteins emphasizes the importance of the balance between the processes of phosphorylation by upstream kinases and dephosphorylation by specific protein phosphatases in the regulation of these signaling routes. In general, the inactivation of the MAPK signaling is essential for cellular physiology in order to recover basal states that allow the cells to respond to ulterior stimuli. When these mechanisms failed, which occurs under conditions of toxicity or brain injury, MAPK signaling becomes over-activated. In this context, protein phosphatases are emerging as critical regulators of the intensity and duration of MAPK signaling. Several families of protein phosphatases have activity on MAPK signaling, and are classified according to substrate specificities: serine/threonine phosphatase (PSP), tyrosine phosphatases (PTP) and dual-specificity phosphatases (DUSP) (Hunter, 1995; Janssens and Goris, 2001; Alonso *et al.*, 2004; Owens and Keyse, 2007).

The dual-specificity phosphatases family (DUSP) forms a heterogeneous group of phosphatases that exhibit selectivity towards both phosphotyrosine and phosphoserine /phosphothreonine motifs. These phosphatases play a critical role in the activity of the MAPK signaling through the dephosphorylation of the threonine-X-tyrosine motive, becoming important negative feedback regulators of the kinase activity (Zhang *et al.*, 2004). The relevance of this type of protein phosphatases in cell maintenance and survival is based on the data regarding

alterations of phosphatases expression and activity in the development of different pathologies as immune, cardiac, neuronal illnesses, cancer and hypoxia.

### **OBJECTIVES.**

In previous work conducted in our laboratory, it was shown that P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptors were coupled to the ERK1/2 signaling mediating a neuroprotective effect against glutamate-triggered excitotoxicity (Ortega *et al.*, 2010). Given that the cerebellar granule neurons are a good model for studying the mechanisms of apoptosis and neuronal survival, we extended our studies in the involvement of purinergic receptors in conditions in which MAP kinase signaling is deregulated, as occurs in conditions of exposure to genotoxic stimuli that cause DNA damage, such as UV light, camptothecin and cisplatin. Furthermore, we then investigated the mechanisms of MAP kinases activation-deactivation processes by dual specificity phosphatases (DUSP) through P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptor activation, as there are many examples in the bibliography involving these phosphatases in the regulation of MAP kinases by negative feedback mechanisms thereby re-establishing proper cellular homeostasis.

These data led us to achieve the objectives that have been developed during the completion of this PhD thesis:

1. Analysis of ERK1/2, JNK and p38 MAP kinases signaling over-activation in conditions of exposure to genotoxic stimuli.
2. The effect of P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptor activation in MAP kinases signaling and in neuronal survival versus genotoxic agents causing DNA damage.
3. Identification and analysis of dual-specificity phosphatases that modulate the activity of MAP kinase via activation of the P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptors.
4. Investigation of the potential neuroprotective role of P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptors against apoptosis induced by genotoxic damage through the expression of dual specificity phosphatases in cerebellar granule neurons.

## RESULTS AND DISCUSSION.

As a first approach of this study, genotoxic conditions were generated upon exposure to UV light, which caused an incorrect cell function, homeostasis alteration, variation in gene expression and loss of cell cycle control (Cadet *et al.*, 2001). In addition, camptothecin was also used, because is a specific inhibitor of topoisomerase I and interferes with the mechanisms of DNA replication and repair, also employed in chemotherapy treatments (Kang *et al.*, 2004; Venditto and Simanek, 2010). These genotoxic stimuli caused long-term activation ERK1/2 and p38-MAPK signaling in cerebellar granule neurons. P2Y<sub>13</sub> and P2X7 nucleotide agonists were able to prevent over-activation of ERK1/2 signaling and restore basal levels of phosphorylation, but only P2Y<sub>13</sub> agonists had effect preventing p38 phosphorylation.

The use of these genotoxic treatments entails with a number of limitations that hinder subsequent studies affecting the reproducibility of the results. The use of camptothecin was discarded because it is a product with low stability and solubility (Wall *et al.*, 1993). In addition, the use of UV light was excluded in BzATP experiments since the benzophenone ring absorbs UV light (Leon *et al.*, 2007). For this reason, we used cisplatin, commonly used in chemotherapy treatments of different types of tumors, such as head and neck, testis, ovary, bladder, oesophagus and lung (Prestayko *et al.*, 1979; Rosenberg *et al.*, 1999; O'Dwyer *et al.*, 2000). Cisplatin toxicity is due to the formation of adducts or bridges between adjacent guanines thereby preventing the action of polymerases and other enzymes involved in DNA replication, causing cell death occurring mostly by apoptosis (Gonzalez *et al.*, 2001). The cisplatin concentration used in our studies was slightly higher than the EC<sub>50</sub> reported to induce cell death by apoptosis in granule neurons, which was around 40  $\mu$ M (Wick *et al.*, 2004). This concentration was in the same range than that used in chemotherapy treatments.

The next step was to check the effect cisplatin treatment on MAPK signaling. As occurred with UV light, p38-MAPK was the most potently activated MAPK along the time, followed by ERK1/2. Regarding JNK proteins, we did not observe any significant effect. In other studies with cerebellar granule neurons, it was reported an increase in phosphorylation of p38-MAPK and ERK1/2, but not JNK, when cells were exposed to toxic concentrations of Cu<sup>2+</sup> (Chen *et al.*, 2009).

Focusing on the P2Y<sub>13</sub> receptor, when granule neurons were pre-treated for 2 hours with 2MeSADP 1  $\mu$ M before the addition of the cytotoxic drug, cisplatin, a considerable reduction in MAPK phosphorylation levels was observed, this effect

being more potent in p38 than in ERK1/2 proteins. P2Y<sub>13</sub> receptor antagonist, MRS-2211, inhibited 2MeSADP-mediated effect, confirming the involvement of this receptor in p38-dephosphorylation.

When using a specific inhibitor of tyrosine phosphatases, orthovanadate, it caused a significant increase in ERK1/2 and p38 MAPK phosphorylation levels, also inhibiting the action of 2MeSADP, and thereby indicating that the P2Y<sub>13</sub> receptor mechanism of action may involve phosphatases that would maintain ERK1/2 signaling homeostasis.

Gene expression studies using by microarrays, carried out previously in our laboratory, revealed that dual specificity phosphatase DUSP2 appeared among the genes with the highest expression in granule neurons stimulated with 2MeSADP (Ortega, 2009). This inducible phosphatase was a good candidate to explain the effect of 2MeSADP restoring MAP kinase signaling, as was selective for both p38-MAPK and ERK1/2. In our results, UV and cisplatin exposure produced a progressive decrease in DUSP2 expression that correlated perfectly with levels of p38-MAPK phosphorylation. These data indicate that the decreased expression of protein phosphatase DUSP2 could contribute to deregulation of p38-MAPK mediated signalling in granule neurons exposed to genotoxic stimuli.

P2Y<sub>13</sub> receptor activation was demonstrated to induce DUSP2 expression at both mRNA and protein levels when phosphatase in granule neurons. Furthermore, in cells treated with cisplatin, 2MeSADP contributed to restore both basal levels of DUSP2 expression and p38 phosphorylation. 2MeSADP-induced DUSP2 expression was abolished upon inhibition of PI3K and ERK1/2 signaling.

Therefore, these results suggest that treatment with cisplatin may be responsible of the transcriptional inhibition of *dusp2* gene, which would explain the loss of expression of this phosphatase, and deregulation of p38-MAPK signaling. Furthermore, DUSP2 protein may be a specific target of P2Y<sub>13</sub> receptor activation through PI3K/ERK1/2 dependent pathway, which would contribute to maintain homeostasis of this MAPK cascade.

In parallel, we also studied the effect of the P2X7 nucleotide receptor in the MAPKs regulation. In comparison to that obtained with 2MeSADP, the P2X7 agonist, BzATP, was able to induce ERK1/2 dephosphorylation, but did not have any effect on p38, upon conditions of cisplatin treatment. In addition, P2X7 receptors were found to be coupled to transient activation of p38-MAPK. This effect was reversed by the P2X7 receptor specific antagonist, the A-438079, confirming the involvement of this receptor type.



In the search for a phosphatase to explain the effect of BzATP, we found that one of the most widely expressed phosphatases in the microarray gene expression studies in granular neurons stimulated with BzATP was DUSP6 (Ortega, 2009), which exhibits selectivity for ERK1/2 and neuronal cells. Besides using orthovanadate as tyrosine phosphatases generic inhibitor, we used BCI, which is a specific inhibitor for DUSP6, and in both cases we observed an increase in ERK1/2 phosphorylation levels, and the inhibition of the dephosphorylating effect of BzATP after cisplatin exposure. These results were indicative of DUSP6 phosphatase being a specific control point for the P2X7 receptor.

DUSP6 expression levels were also diminished when the cells were treated with cisplatin. In contrast, when the cells were treated with BzATP prior to stimulation with genotoxic stimulus, besides causing the dephosphorylation of ERK1/2, it partially recovered the DUSP6 protein expression levels. When we analyzed DUSP6 expression in cells stimulated with BzATP, we found a biphasic behavior. In the first stage we observed a decrease in DUSP6 levels upon BzATP stimulation, indicating a degradative event, as this was abolished in the presence of a proteasome inhibitor. This was followed by a delayed increase in DUSP6 protein levels, probably due to transcriptional activation (Marchetti *et al.*, 2005; Jurek *et al.*, 2009).

The same effect was obtained with the epidermal growth factor (EGF), taken as a positive control of DUSP6 expression, as described in the literature, which is capable of inducing the expression of some DUSP family phosphatases, including DUSP6 (Cooper *et al.*, 1982; Sarkozi *et al.*, 2007). Simultaneous stimulation with BzATP and EGF had an additive effect on both ERK1/2 dephosphorylation and DUSP6 expression. This additive effect could be explained on the basis of BzATP and EGF displaying different mechanisms at the level of transcription induction of DUSP6. EGF activated DUSP6 transcription through ERK1/2 dependent signaling. However, p38-mediated activation by BzATP was responsible of DUSP6 expression.

Cell viability assays were employed for neuroprotection studies. We found that both nucleotidic agonists, 2MeSADP and BzATP, were able to prevent cell death against cisplatin and UV apoptotic stimuli, moreover, this neuroprotective effect was abolished by P2Y<sub>13</sub> and P2X7 specific receptor antagonists (MRS-2211 and A-438079, respectively). In addition, neuroprotection was also lost in the presence of the ERK1/2 inhibitor (U-0126), and by phosphatase inhibitors (orthovanadate and BCI). Therefore, we can conclude that ERK1/2 signalling

pathway and DUSP phosphatase activity were essential for the neuroprotective effect displayed by P2Y<sub>13</sub> and P2X7 nucleotide receptors against cell death induced by genotoxic stimuli. In addition, P2X7 receptor survival effect also depended on p38 signaling.

Finally, this Thesis has demonstrated for the first time the coupling/mating of purinergic receptors to the expression and activity of dual specificity phosphatases in a neuronal model, through which contributes to the homeostasis of MAPK signalling maintenance. It also demonstrates the importance of negative feedback regulatory processes as important targets in the function and regulation of cell survival.

### **CONCLUDING REMARKS.**

1. Genotoxic stimuli induce an overactivation prolonged in granule neurons in the time of the family of the MAPKs proteins ERK1/2 and p38-MAPK, but not of JNK.
2. The P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptors prevent the overactivation of the ERK1/2 and p38-MAPK proteins and increase the survival against apoptosis induced by genotoxic stress.
3. The P2Y<sub>13</sub> receptor by means of the activation of the route of ERK1/2, signaling provokes the expression of the DUSP2 phosphatase that mediates p38-MAPK dephosphorylation in the nucleus.
4. The P2X7 and the EGF receptors regulate the levels of constitutive dual specificity phosphatase, DUSP6, in a biphasic manner. In a first stage, transient activation of ERK1/2 mediated by both receptors leads to phosphorylation and degradation of DUSP6. In a second stage, they induce the transcriptional expression of DUSP6 to terminate signaling ERK1/2.
5. The P2X7 receptor through the activation of p38 signaling activates the expression of DUSP6 phosphatase that promotes the decrease of ERK1/2 phosphorylation levels in the cytosol.
6. DUSP2 and DUSP6 phosphatases are involved in the neuroprotective effect of P2Y<sub>13</sub> and P2X7 receptors, respectively, against the exposition to DNA damage inducing agents in cerebellar granular neurons.

**BIBLIOGRAFY.**

- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A. and Weisman, G. A. (2006). "International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy." Pharmacol Rev 58(3): 281-341.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. and Zimmermann, H. (2009). "Purinergic signalling in the nervous system: an overview." Trends Neurosci 32(1): 19-29.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T. (2004). "Protein tyrosine phosphatases in the human genome." Cell 117(6): 699-711.
- Burnstock, G. (1978). "A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach." Ed. Straub, R.W. y Bolis, L. Raven Press, Nueva York: 107-118.
- Burnstock, G. (2007). "Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission." Physiol Rev 87(2): 659-797.
- Burnstock, G. (2008). "Purinergic signalling and disorders of the central nervous system." Nat Rev Drug Discov 7(7): 575-590.
- Cadet, J., Douki, T., Pouget, J. P., Ravanat, J. L. and Sauvaigo, S. (2001). "Effects of UV and visible radiations on cellular DNA." Curr Probl Dermatol 29: 62-73.
- Cavaliere, F., Amadio, S., Angelini, D. F., Sancesario, G., Bernardi, G. and Volonte, C. (2004). "Role of the metabotropic P2Y(4) receptor during hypoglycemia: cross talk with the ionotropic NMDAR1 receptor." Exp Cell Res 300(1): 149-158.
- Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." Cerebellum 1(1): 41-55.
- Cooper, J. A., Bowen-Pope, D. F., Raines, E., Ross, R. and Hunter, T. (1982). "Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins." Cell 31(1): 263-273.
- Chen, X., Lan, X., Mo, S., Qin, J., Li, W., Liu, P., Han, Y. and Pi, R. (2009). "p38 and ERK, but not JNK, are involved in copper-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons." Biochem Biophys Res Commun 379(4): 944-948.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C. and Perez, J. M. (2001). "Is cisplatin-induced

cell death always produced by apoptosis?" Mol Pharmacol **59**(4): 657-663.

**Hervas, C., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T.** (2003). "Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells." J Neurosci Res **73**(3): 384-399.

**Hunter, T.** (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling." Cell **80**(2): 225-236.

**Janssens, V. and Goris, J.** (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." Biochem J **353**(Pt 3): 417-439.

**Junttila, M. R., Li, S. P. and Westermarck, J.** (2008). "Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival." FASEB J **22**(4): 954-965.

**Kang, M. R., Muller, M. T. and Chung, I. K.** (2004). "Telomeric DNA damage by topoisomerase I. A possible mechanism for cell killing by camptothecin." J Biol Chem **279**(13): 12535-12541.

**Leon, D., Marin-Garcia, P., Sanchez-Nogueiro, J., de la, O. F., Garcia-Carmona, F. and Miras-Portugal, M. T.** (2007). "P2X agonist BzATP interferes with amplex-red-coupled fluorescence assays." Anal Biochem **367**(1): 140-142.

**Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J. C., Touboul, T., Roux, D., Pouyssegur, J. and Pages, G.** (2005). "Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation." Mol Cell Biol **25**(2): 854-864.

**O'Dwyer, P. J., Stevenson, J. P. and Johnson, S. W.** (2000). "Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs." Drugs **59 Suppl 4**: 19-27.

**Ortega, F., Perez-Sen, R., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T.** (2009). "P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons." Neurotox Res **15**(3): 193-204.

**Ortega, F., Perez-Sen, R., Delicado, E. G. and Teresa Miras-Portugal, M.** (2011). "ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons." Neuropharmacology **61**(8): 1210-1221.

**Ortega, F., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T.** (2008). "Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons." J Neurochem **104**(1): 62-73.

- Ortega, F., Perez-Sen, R., Morente, V., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2010). "P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons." Cell Mol Life Sci 67(10): 1723-1733.
- Owens, D. M. and Keyse, S. M. (2007). "Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases." Oncogene 26(22): 3203-3213.
- Prestayko, A. W., D'Aoust, J. C., Issell, B. F. and Crooke, S. T. (1979). "Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II)." Cancer Treat Rev 6(1): 17-39.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., White, D. E. and Steinberg, S. M. (1999). "Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b." J Clin Oncol 17(3): 968-975.
- Sarkozi, R., Miller, B., Pollack, V., Feifel, E., Mayer, G., Sorokin, A. and Schramek, H. (2007). "ERK1/2-driven and MKP-mediated inhibition of EGF-induced ERK5 signaling in human proximal tubular cells." J Cell Physiol 211(1): 88-100.
- Stefano, L., Rossler, O. G., Griesemer, D., Hoth, M. and Thiel, G. (2007). "P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca(2+) rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1." J Cell Physiol 213(1): 36-44.
- Surprenant A, N. R. (2008). "Signaling at Purinergic P2X Receptors." Annu Rev Physiol.
- Venditto, V. J. and Simanek, E. E. (2010). "Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature." Mol Pharm 7(2): 307-349.
- Wall, M. E., Wani, M. C., Nicholas, A. W., Manikumar, G., Tele, C., Moore, L., Truesdale, A., Leitner, P. and Besterman, J. M. (1993). "Plant antitumor agents. 30. Synthesis and structure activity of novel camptothecin analogs." J Med Chem 36(18): 2689-2700.
- Wick, A., Wick, W., Hirrlinger, J., Gerhardt, E., Dringen, R., Dichgans, J., Weller, M. and Schulz, J. B. (2004). "Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: in vitro paradigm of differential neurotoxicity." J Neurochem 91(5): 1067-1074.
- Zhang, Y., Blattman, J. N., Kennedy, N. J., Duong, J., Nguyen, T., Wang, Y., Davis, R. J., Greenberg, P. D., Flavell, R. A. and Dong, C. (2004). "Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5." Nature 430(7001): 793-797.

**Zimmermann, H.** (2006). "Nucleotide signaling in nervous system development."  
Pflügers Arch **452**(5): 573-588.



# *Introducción*







## 1. EL SISTEMA PURINÉRGICO.

### 1.1. Los nucleótidos en la neurotransmisión.

El ATP (adenosina 5'-trifosfato) es una molécula indispensable para el desarrollo de la vida. A nivel intracelular participa como fuente de energía en el metabolismo celular, en la regulación enzimática, el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana, el trabajo mecánico del movimiento celular y como integrante estructural de los ácidos nucleicos. Además, su gran tamaño y su naturaleza iónica impiden que atraviese libremente la membrana plasmática de las células vivas. Por otro lado, en el exterior de la célula es rápidamente hidrolizado por acción de las ectonucleotidasas, lo cual explica el enorme retraso en el reconocimiento del papel que juegan los nucleótidos como mensajeros extracelulares. Sin embargo, hoy en día se conoce la participación de estas moléculas en multitud de procesos extracelulares, entre los que se encuentran la contracción muscular, la secreción endocrina y paracrina, la respuesta inmune e inflamatoria, la agregación plaquetaria, la función cardíaca, y dentro del sistema nervioso, en la transmisión del dolor, neuroprotección, control central de funciones autónomas y modulación de la neurotransmisión (Gordon, 1986; Dubyak y el-Moatassim, 1993; Burnstock, 1997, Burnstock, 2007a; Neary y Zimmermann, 2009; Burnstock 2011; Burnstock 2013).

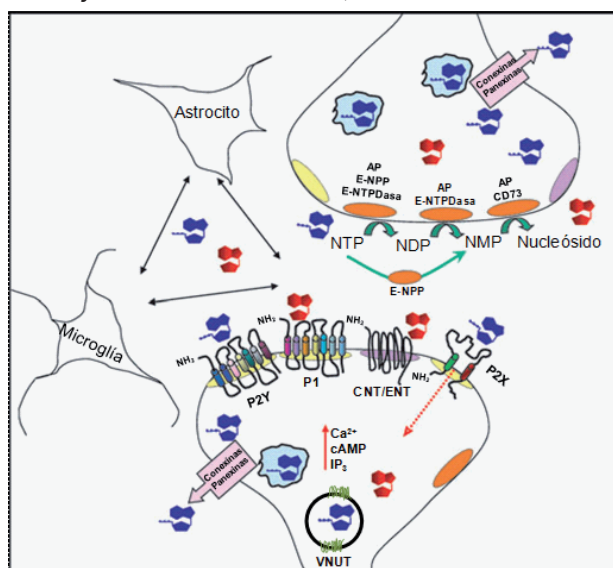
Las primeras evidencias de la actuación de las purinas como mensajeros extracelulares fueron aportadas por los estudios realizados en el sistema cardiovascular por Drury y Szent-Györgyi en 1929 (Drury y Szent-Gyorgyi, 1929). Sin embargo, pasaron 40 años hasta que se descubrieron unos nervios denominados no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC), que liberaban ATP como neurotransmisor (Burnstock y cols., 1970; Burnstock y cols., 1972).

En 1983, Jahr y Jessel obtuvieron la primera prueba directa de las acciones extracelulares del ATP en el sistema nervioso central (SNC), al registrar corrientes de entrada en neuronas del asta dorsal de la médula espinal tras la estimulación con ATP (Jahr y Jessell, 1983). Simultáneamente, Krishtal y cols. observaron el mismo efecto en neuronas de diversos ganglios sensoriales (Krishtal y cols., 1983). Posteriormente se describió la implicación del ATP en la transmisión de sensaciones propioceptivas (Salter y cols., 1993) y de señales nociceptivas medulares (Chen y cols., 1995). En lo referente a estructuras centrales, se registraron por primera vez corrientes postsinápticas excitatorias inducidas por ATP en cortes de habénula medial (Edwards y cols., 1992) y en el hipocampo

(Pankratov y cols., 1998).

Todo ello indicaba que el ATP debía y debe ser considerado un verdadero neurotransmisor rápido dentro del SNC. Además, puede ejercer también acciones a largo plazo en las neuronas, estando implicado en procesos como diferenciación, crecimiento de neuritas o supervivencia, además de intervenir en procesos patológicos como isquemia, enfermedades neurodegenerativas o trauma cerebral (Burnstock, 2007a, Burnstock, 2008).

Recientemente se ha denominado *purinoma* al complejo molecular responsable de los efectos biológicos de los ligandos extracelulares de purina y pirimidina (Figura 1). Este purinoma englobaría todo el conjunto de ligandos purinérgicos y pirimidinérgicos, de receptores purinérgicos sobre los que actúan como receptores de nucleósidos P1 y receptores de nucleótidos P2), así como las enzimas que los metabolizan denominadas ectonucleotidasas y de proteínas que los internalizan entre los que se incluyen los transportadores de nucleósidos y nucleótidos (Volonte y D'Ambrosi, 2009).



**Figura 1. Esquema representativo del purinoma.** La maquinaria proteica involucrada en la interacción biológica de los ligandos extracelulares de purina y pirimidina: receptores como los P2X y P2Y de nucleótidos tri- y di-fosfatos, o los receptores de nucleósidos y nucleótidos monofosfato P1; enzimas de hidrólisis de nucleótidos extracelulares, como las ecto-nucleótido trifosfo difosfohidrolasas (E-NTPDasas), pirofosfatasas/fosfodiesterasas (E-NPP), ecto-5'nucleotidasa (CD73) y fosfatasas alcalinas (AP); transportadores de nucleósidos (CNT/ENT); transportadores de nucleótidos (VNUT) y canales (conexinas y panexinas). Adaptado de (Volonté y D'Ambrosi 2009).

## **1.2. Almacenamiento, liberación y degradación de nucleótidos.**

El papel del ATP o de cualquier otro nucleótido como agente neurotransmisor requiere de la presencia de dichos compuestos en el medio extracelular. En este sentido, se ha descrito que el ATP y otros nucleótidos están

presentes en una amplia variedad de vesículas de almacenamiento y secreción, como por ejemplo las vesículas aminérgicas y colinérgicas de los tejidos neurales o neuroendocrinos, o los gránulos de plaquetas y mastocitos (Burnstock, 2007a). Sin embargo, hasta hace poco tiempo se asumía que la única fuente de ATP extracelular procedía de células dañadas o muertas. Hoy en día está reconocido que la liberación de ATP por parte de células sanas es un mecanismo fisiológico (Bodin y Burnstock, 2001; Lazarowski y cols., 2003).

El concepto de cotransmisión acuñado en los años 70 del siglo XX ya postulaba la idea de que una misma célula nerviosa podía almacenar y liberar diferentes tipos de neurotransmisores. De acuerdo con este concepto, se describió posteriormente el almacenamiento y liberación del ATP en terminales colinérgicas (Richardson y Brown, 1987), noradrenérgicas simpáticas y parasimpáticas (von Kügelgen y Starke, 1991) y GABAérgicas del asta dorsal de la médula espinal (Jo y Schlichter, 1999; Jo y Role, 2002), además de la liberación excitotóxica y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  del ATP en terminales nerviosas centrales aisladas (Sawynok y cols., 1993). Todos estos estudios, unidos a multitud de estudios posteriores, establecen firmemente el concepto de cotransmisión que se conoce en la actualidad (Pankratov y cols., 2006).

Además de los nucleótidos clásicos se conoce una familia de compuestos nucleotídicos relacionados estructuralmente con el ATP denominados diadenosina polifosfatos ( $\text{Ap}_n\text{A}$ ). Estos compuestos, que también se almacenan en vesículas secretoras, ejercen sus acciones tanto a nivel intracelular como extracelular en el SNC y periférico (Pintor y cols., 1993). Se trata de compuestos naturales formados por dos moléculas de adenosina unidas por una cadena de grupos fosfato de longitud variable ( $n = 2-7$ ). Se detectaron por primera vez almacenados en gránulos cromafines junto con ATP y otros neurotransmisores (Rodríguez del Castillo y cols., 1988; Pintor y cols., 1991; Pintor y cols., 1992). Los diadenosina polifosfatos, principalmente el  $\text{Ap}_4\text{A}$  y el  $\text{Ap}_5\text{A}$ , se encontraron junto con el ATP, ADP (adenosina 5'-difosfato) y GTP (guanosina 5-trifosfato) en vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (Pintor, 1992). También se liberan por exocitosis junto con el ATP en terminales nerviosas de rata (Pintor y cols., 1993, 1995), lo cual apoya el papel transmisor de los nucleótidos y dinucleótidos en la neurotransmisión. Además, se ha demostrado la capacidad del dinucleótido  $\text{Ap}_5\text{A}$  y del ATP de promover la liberación de glutamato, acetilcolina y GABA en terminaciones sinápticas aisladas de cerebro medio de rata, reconociéndose de este modo su importante papel neuromodulador (Díaz-Hernández y cols., 2001; Gómez-Villafuertes y cols.,

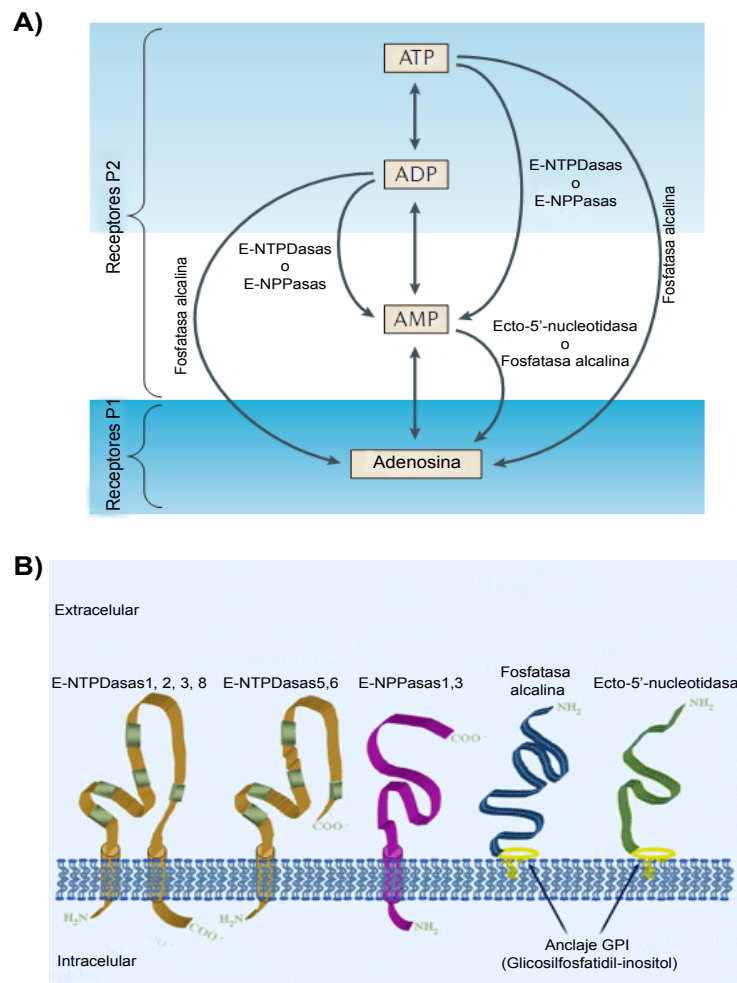
2001; Diaz-Hernandez y cols., 2002a; Gomez-Villafuertes y cols., 2003; Gualix y cols., 2003; Diaz-Hernandez y cols., 2004a; Gomez-Villafuertes y cols., 2004).

El hecho de que los nucleótidos y dinucleótidos de adenina se almacenen en el interior de vesículas de secreción alcanzando concentraciones mucho mayores de las que se encuentran en el citoplasma celular (>100 mM frente a 2-5 mM), pone de manifiesto la necesidad de un sistema de transporte activo específico. Hasta hace muy poco se conocían algunas características funcionales y cinéticas de dicho transportador, como la baja especificidad que permitía el transporte de una gran variedad de nucleótidos, o su comportamiento mnemónico (Gualix y cols., 1997; Gualix y cols., 1999), pero la proteína responsable del transporte no se había identificado. En 2008, Sawada y cols. presentaron evidencias de la actuación de la proteína SLC17A9 como transportador vesicular de nucleótidos (VNUT). Se trata de una isoforma de la familia de los transportadores SLC17 con 12 segmentos transmembrana y 430 aminoácidos. Esta proteína ha sido identificada tanto en humano como en ratón fundamentalmente en el cerebro y en la médula adrenal, donde juega un papel vital en el almacenamiento y liberación de nucleótidos (Sawada y cols., 2008).

Además de lo anteriormente mencionado existen múltiples evidencias obtenidas en diversos tipos celulares, como células endoteliales, musculares y gliales, que señalan la existencia de una liberación de ATP no exocitótica en respuesta a estímulos como hipoxia, inflamación, daño tisular o estrés mecánico (Bodin y Burnstock, 2001).

Los mecanismos de liberación no exocitótica de nucleótidos de adenina no están totalmente identificados, aunque se ha propuesto que podrían estar mediados por una serie de transportadores o canales que forman parte de la superfamilia de proteínas ABC ("ATP-binding cassette"). Otras hipótesis señalan la posible participación de canales iónicos dependientes de voltaje, conexinas, panexinas y otras uniones gap (Buettner y cols., 2000; Bahima y cols., 2006; Eltzschig y cols., 2006). Tampoco podemos olvidar que el UTP (Uridina-5'-O-(3-tiotrifosfato)), UDP (Uridina 5'-difosfato) y UDP-glucosa son compuestos funcionales en el aparato de Golgi y el grupo del Dr. Boucher ha propuesto su salida mediante exocitosis constitutiva como excedente de la funcionalidad del aparato de Golgi (Lazarowski, 2006).

Como todos los neurotransmisores, los nucleótidos deben ser inactivados, degradados o retirados del medio extracelular para evitar su acción prolongada (Figura 2). Así, una vez en la hendidura sináptica, son rápidamente hidrolizados



**Figura 2. Liberación y metabolismo de los nucleótidos. A)** Una vez liberados al espacio extracelular por exocitosis o a través de transportadores, los nucleótidos activan receptores P2Y y P2X. Su acción finaliza por actuación de las ectonucleotidasas, que degradan los nucleótidos trifosfato hasta adenosina, pudiendo generar nucleótidos difosfato que a su vez siguen activando otros receptores P2. Por último se produce adenosina que activa por su parte a sus propios receptores, siendo finalmente recaptada para la síntesis de nuevos nucleótidos. **B)** Esquema estructural de algunos miembros de la familia de las E-NTPDasas, E-NPPasas, de la fosfatasa alcalina y de la ecto-5'-nucleotidasa. Figuras modificadas de (Fields y Burnstock 2006).

por unas enzimas extracelulares específicas denominadas ectonucleotidasas. Como consecuencia de esta hidrólisis los nucleótidos van perdiendo secuencialmente sus grupos fosfato, generando diferentes metabolitos hasta sus correspondientes nucleósidos precursores (Harkness, 1968; Miki y cols., 1986), que a su vez pueden actuar como ligandos fisiológicos de otros receptores purinérgicos.

Las ectonucleotidasas están formadas por varias familias de enzimas que se pueden diferenciar gracias a sus propiedades funcionales y moleculares. Varían en su preferencia y afinidad por el sustrato, en el producto formado, la dependencia de cationes y el pH óptimo catalítico. Se encuentran ampliamente distribuidas en todos los tejidos y actúan de forma concertada o consecutiva formando cascadas



de hidrólisis. Normalmente se encuentran ancladas a la membrana celular con su dominio catalítico orientado hacia el espacio extracelular, aunque también se han descrito formas solubles liberadas al medio (denominadas exonucleotidasas) a partir de vesículas sinápticas o, como la ecto-5'-nucleotidasa, como resultado de la hidrólisis de su anclaje a la membrana (Todorov y cols., 1997). Además, existen evidencias de la multifuncionalidad de estas enzimas, pudiendo actuar también en procesos de adhesión celular o en funciones de receptores transmembrana (Zimmermann y cols., 2007; Kukulski y cols., 2011; Kukulski y cols., 2011).

Las ectonucleotidasas se clasifican en las siguientes familias (Tabla 1):

**Ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasas (E-NTPDasas).** También se conocen como ecto-ATPasas, ecto-ADPasas, ecto-apiratasas o CD39. Esta familia está formada por 8 miembros, de los cuales sólo las NTPDasas 1, 2, 3 y 8 son enzimas extracelulares de membrana, con dos hélices transmembrana y un dominio extracelular largo portador del sitio catalítico (Bigonnesse y cols., 2004; Robson y cols., 2006). Hidrolizan nucleósidos tri- y difosfato, generando los correspondientes monofosfatos, aunque los ratios de hidrólisis varían considerablemente entre las cuatro enzimas (Kukulski y cols., 2005).

**Ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas (E-NPP).** Estas enzimas son glicoproteínas ancladas a membrana por un único segmento, con el extremo catalítico hacia el espacio extracelular. Comparten su pH óptimo catalítico alcalino con las fosfatasas alcalinas. Los tres miembros de esta familia de ectoenzimas, NPP1, 2 y 3, hidrolizan enlaces 5'-monodiestéres en nucleótidos y sus derivados, generando la liberación de nucleósidos 5'-monofosfato (Goding y cols., 2003; Stefan y cols., 2005). También pueden hidrolizar otros compuestos, como los dinucleósido polifosfatos (Vollmayer y cols., 2003).

**Ecto-5'-nucleotidasa.** También se la conoce como CD73. Es una proteína dimérica de unión a zinc, anclada a la membrana por un glicosilfosfatidil inositol (GPI), que hidroliza los nucleósidos monofosfato generando los respectivos nucleósidos. Es decir, cataliza la etapa final de la cadena de hidrólisis de los nucleótidos. Se encuentra ampliamente distribuida entre los diferentes tejidos (Zimmermann, 1996; Zimmermann 2000).

**Fosfatasas alcalinas.** Estas enzimas forman homodímeros y poseen tres cationes en cada sitio catalítico. Liberan el fosfato inorgánico de una gran variedad de compuestos e hidrolizan nucleósidos 5'-tri-, -di- y -monofosfato, generando los correspondientes nucleósidos (Millan, 2006). Las cuatro isoformas de la familia, placentar, intestinal, de células germinales y no específica de tejido

**Tabla 1. Familias de ectonucleotidasas.** Tomado de (Robson y cols., 2006; Zimmermann y cols., 2007; Kukulski y cols., 2011).

Ecto-Nucleotidasas		Reacción catalizada	Inhibidores
<i>Familia Ecto-NTPDasa</i>	<i>Preferencia de sustrato</i>		
NTPDasa 1 (CD39)	NTP ≈ NDP	NTP → NMP + 2P <sub>i</sub>	ARL 67156; 8-BuS-ATP; polioxometalatos; antagonistas receptores P2.
NTPDasa 2 (CD39L1)	NTP >>> NDP	NDP → NMP + P <sub>i</sub>	
NTPDasa 3 (CD39L3)	NTP > NDP		
NTPDasa 8	NTP > NDP		
<i>Familia Ecto-nucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasas</i>		NTP, NDP → NMP Dinucleósido polifosfatos → NMP + Np <sub>n-1</sub>	Antagonistas receptores P2; heparina; heparán sulfatos.
NPP1, NPP2, NPP3		NAD+ → AMP + nicotinamida mononucleótido	
		UDP-glucosa → UMP + Glucosa-6-fosfato	
<i>Ecto-5´-nucleotidasa</i>		NMP→Nucleósido+P <sub>i</sub>	AOPCP
<i>Fosfatasa alcalina</i>			
TNAP			Levamisol L-homoarginina
Placental		NTP → NDP → AMP → Nucleósido + 3P <sub>i</sub>	
Intestinal			
De células germinales			L-fenilalanina

(TNAP), poseen un pH óptimo alcalino y se encuentran ancladas a la membrana plasmática gracias a un GPI (Ogata y cols., 1988). Son enzimas alostéricas no competitivas (Hoylaerts y cols., 1997). Su distribución varía en gran medida entre humanos y roedores (Millan, 2006).



### 1.3. Receptores de adenosina.

Hasta la fecha se han clonado y caracterizado cuatro tipos de receptores específicos de adenosina, denominados inicialmente receptores P1. Actualmente se los conoce como:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  (Olah y Stiles, 2000; Fredholm y cols., 2001; Yaar y cols., 2005). Todos ellos poseen 7 dominios transmembrana y están acoplados a proteínas G y modulación de la actividad adenilato ciclasa principalmente. Existen varios agonistas y antagonistas específicos de los distintos subtipos de receptor, como se muestra en la Tabla 2 (Burnstock, 2007b, Burnstock, 2011). Estos receptores pueden mediar diversos efectos fisiológicos como modulación del sistema cardiovascular, inmune y nervioso (Ledent y cols., 1997; Sun y cols., 2001a). A modo de ejemplo, en nuestro grupo se ha demostrado que la activación de los receptores presinápticos de adenosina modulan la respuesta a dinucleótidos en terminales nerviosos de cerebro de rata (Díaz-Hernández y cols., 2000; Díaz-Hernández y cols., 2002b).

**Tabla 2. Clasificación de los receptores de adenosina.** Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de (Fredholm y cols. 2001; Burnstock, 2007b; Burnstock y cols., 2012).

Receptor	Agonistas	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
$A_1$	CCPA, CPAS-ENBA, CVT-510	DPCPX, N-0840, MRS1754, WRC-0571	$G_{i/o} \downarrow \text{AMPc} \uparrow \text{IP}_3$	Cerebro, médula espinal, testículos, corazón, terminales nerviosas autónomas.
$A_{2A}$	CGS 21680 HE-NECA, CVT-3146	KF17837, SCH58261, ZM241385, K2 6002	$G_s \uparrow \text{AMPc}$	Cerebro, corazón, pulmón, bazo.
$A_{2B}$	NECA (no selectivo)	Enprofilina, MRE2029-F20, MRS17541, MRS 1706	$G_s \uparrow \text{AMPc}$ $G_{q/11} \uparrow \text{IP}_3$	Intestino grueso, vejiga.
$A_3$	IB-MECA, 2-CI-IB-MECA DBXRM, VT160	MRS1220, L-268605, MRS1191, MRS1523, VUF8504	$G_{i/o} G_{q/11} \downarrow \text{AMPc} \uparrow \text{IP}_3$	Pulmón, hígado, cerebro, testículos, corazón

### 1.4. Receptores de nucleótidos.

Los receptores específicos de nucleótidos, o receptores P2, se dividen en dos familias en función de su estructura molecular y de los mecanismos de transducción de la señal acoplados a su activación: los receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y los receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Abbracchio y Burnstock, 1994). Hasta

la fecha, en mamíferos se han clonado y caracterizado farmacológicamente siete subunidades diferentes que constituyen los receptores P2X (P2X1-P2X7) y ocho subtipos de receptores P2Y (P2Y<sub>1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14</sub>) (North, 2002; Burnstock, 2007b; Burnstock, 2011; Burnstock, 2013). La nomenclatura empleada en esta Tesis Doctoral tiene en cuenta las últimas directrices del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR) (Collingridge y cols., 2009; Coddou y cols., 2011).

La identificación y caracterización farmacológica de los receptores P2 no resulta una tarea sencilla. La falta de disponibilidad de agonistas y antagonistas específicos y potentes para diferenciar bien los distintos subtipos hace que se produzca solapamiento de las respuestas obtenidas en sistemas que coexpresan varios subtipos de receptores. Además, las ectonucleotidasas presentes pueden degradar o transformar los compuestos utilizados. Por lo tanto, aunque haya sido posible encontrar en los tejidos nativos receptores análogos a algunos de los receptores P2 clonados (coincidiendo en la distribución, mecanismos de señalización y farmacología), en la mayoría de los casos no se ha podido establecer una correspondencia inequívoca. Por este motivo se tiende a calificar a los receptores endógenos con el sufijo anglosajón “-like” (“P2X1-like”, “P2Y<sub>2</sub>-like”, etc.) hasta que se apliquen criterios posteriores que corroboren su identificación.

#### 1.4.1. Receptores metabotrópicos P2Y.

Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G pertenecientes a la familia de los receptores de rodopsina clase A, concretamente al grupo  $\delta$ , que también incluye a los receptores de unión a glicoproteínas, los PARs y los receptores olfativos (Lagerstrom y Schioth, 2008). Los primeros miembros de esta familia en ser clonados fueron el P2Y<sub>1</sub>, en cerebro de pollo, y el P2Y<sub>2</sub>, en oocitos de *Xenopus* en 1993 (Webb y cols., 1993; Lustig y cols., 1993). Actualmente la familia consta de ocho subtipos clonados y caracterizados en tejidos humanos o de mamíferos: P2Y<sub>1</sub> (Tokuyama y cols., 1995; Ayyanathan y cols., 1996; Schachter y cols., 1996), P2Y<sub>2</sub> (Lustig y cols., 1993; Parr y cols., 1994), P2Y<sub>4</sub> (Communi y cols., 1995; Nguyen y cols., 1995), P2Y<sub>6</sub> (Chang y cols., 1995; Communi y cols., 1996a), P2Y<sub>11</sub> (Communi y cols., 1997), P2Y<sub>12</sub> (Hollopeter y cols., 2001), P2Y<sub>13</sub> (Communi y cols., 2001; Fumagalli y cols., 2004) y P2Y<sub>14</sub> (Chambers y cols., 2000; Abbracchio y cols., 2003) (Tabla 3). Los saltos en la numeración de estos receptores se corresponden con aquellos identificados inicialmente como receptores P2Y y descartados posteriormente al descubrir sus ligandos principales, como el receptor de leucotrieno LTB<sub>4</sub>, inicialmente denominado P2Y<sub>7</sub> (Yokomizo

y cols., 1997), el P2Y<sub>9</sub> que, en realidad, es un receptor de ácido lisofosfatídico 4, LPA4 (Noguchi y cols., 2003), o el P2Y<sub>15</sub>, receptor de  $\alpha$ -cetoglutarato (Inbe y cols., 2004). Otras veces, estos saltos de numeración corresponden a receptores clonados en vertebrados no mamíferos cuyos ortólogos mamíferos aún no han sido identificados, como es el caso del P2Y<sub>3</sub> y P2Y<sub>8</sub> obtenidos de cerebro de pollo y de *Xenopus laevis*, respectivamente (Webb y cols., 1996; Bogdanov y cols., 1997). Los receptores P2Y están distribuidos ubicuamente por todo el organismo (Tabla 3) mediando por sí mismos o modulando multitud de funciones, como la agregación plaquetaria en el caso de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>12</sub> (Gachet, 2006), siendo el fármaco clopidogrel muy utilizado para la inhibición de la formación de coágulos a través de la inactivación del receptor P2Y<sub>12</sub> (Savi y Herbert, 2005; von Kügelgen y Harden, 2011). Por otro lado, en terapias contra la fibrosis quística, se ha propuesto el uso de agonistas del receptor P2Y<sub>2</sub> para utilizarlos en tratamientos contra esta enfermedad (Yerxa, 2001).

Además de los receptores identificados hasta la fecha, pueden existir otros subtipos P2Y no identificadas aún (von Kügelgen, 2006). De hecho se han identificado varios receptores huérfanos asociados a los P2Y. Entre ellos, el GPR17, que se describió primero como un receptor de cisteil-leucotrienos y posteriormente se observó que también respondía a UDP (Inbe y cols., 2004; Ciana y cols., 2006).

Este receptor, muy abundante en telencéfalo, tanto en neuronas como en precursores de oligodendrocitos, actúa como un sensor de daño cerebral, jugando un papel muy importante tanto en la muerte neuronal por daño isquémico, como en la modulación de la respuesta de reparación, remodelación y remielinización (Lecca y cols., 2008). Otros receptores huérfanos asociados a los P2Y, ya que tienen las secuencias estructurales de los segmentos transmembrana TM6 y TM7 en común con ellos, son los GPR34, H963 y GPR87 (Schoneberg y cols., 1999; Joost y Methner, 2002; Vassilatis y cols., 2003), aunque este último ha sido identificado en realidad como un receptor de ácido lisofosfatídico cuya estructura indica que podía haber evolucionado a partir de un antecesor P2Y común (Tabata y cols., 2007).

#### 1.4.1.1. Estructura de los receptores P2Y.

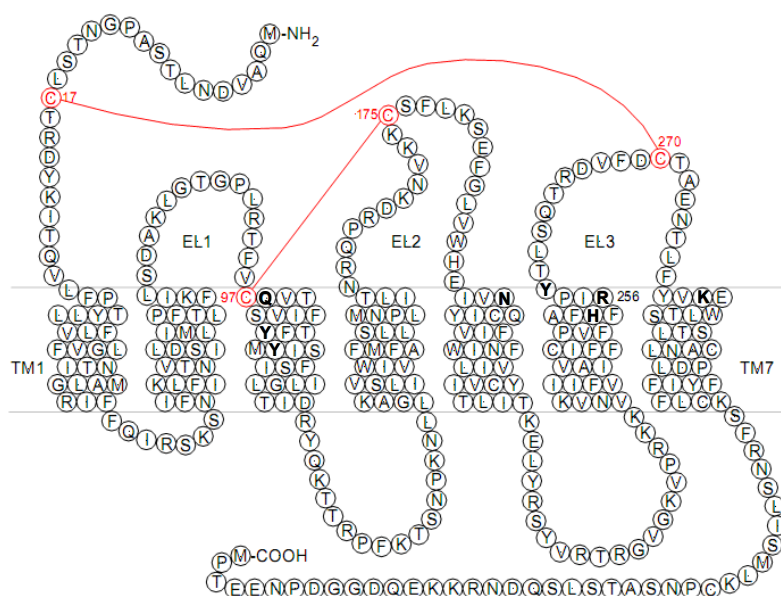
En general, los receptores P2Y responden a la estructura de un receptor acoplado a proteínas G, con 7 segmentos transmembrana hidrofóbicos conectados por tres lazos extracelulares y tres intracelulares, con el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular (Figura 3). Estos receptores

**Tabla 3. Clasificación de los receptores P2Y.** Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de (von Kugelgen and Wetter 2000; Moore y cols. 2001; Abbracchio y cols., 2003; King and Townsend-Nicholson 2003; von Kugelgen, 2006; Burnstock, 2007b; von Kugelgen y Harden 2011; Burnstock y cols., 2012).

Receptor	Potencia de agonistas (EC <sub>50</sub> )	Antagonistas	Transducción de la señal	Distribución mayoritaria
P2Y <sub>1</sub>	2MeSADP > ADPβS > 2MeSATP = ADP > ATP ADP y UDP inactivos Ap <sub>2A</sub> > Ap <sub>2A</sub>	MRS 2279 > MRS 2179 > Suramina > PPADS	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Plaquetas, cerebro, placenta, próstata, endotelio, corazón, tracto digestivo, células gliales.
P2Y <sub>2</sub>	ATP ≈ UTP > Ap <sub>4A</sub> ADP, UDP y 2MeSATP inactivos	Suramina > Azul reactivo 2, ARC126313	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>0</sub> , G <sub>12</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Músculo esquelético, músculo liso, pulmón, hueso, macrófagos, bazo, linfocitos, osteoblastos, riñón.
P2Y <sub>4</sub>	UTP = ATP = Ap <sub>2A</sub> (rata)	PPADS Azul reactivo 2 (rata) > Suramina	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> , G <sub>0</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Intestino, cerebro, pituitaria, médula ósea, linfocitos, monocitos, intestino, hígado.
P2Y <sub>6</sub>	UDPβS > UDP > UTP > ADP > 2MeSATP	Azul Reactivo 2 > PPADS > Suramina, MRS2578	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup>	Placenta, bazo, riñón, corazón, músculo liso vascular, células adiposas, intestino, cerebro, timo, pulmón.
P2Y <sub>11</sub>	ATPβS » BzATP > ATP > 2MeSATP	Suramina > Azul reactivo 2, NF157, 5'-AMPPs	G <sub>q</sub> /G <sub>11</sub> y Gs PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Activación AC	Cerebro, hígado, bazo, pituitaria, intestino, linfocitos B, células dendríticas, granulocitos.
P2Y <sub>12</sub>	2MeSADP = 2MeSATP >> ADP >> ATP UTP y UDP inactivos	AR-C69931, AR-C66096, Clopidogrel, Ticlopidina, Azul Reactivo 2, Suramina, 2MeSAMP, CT50547, AZD6140, INS49266, PSB0413, PPADS inactivo, BzATP (rata)	G <sub>i</sub> Inhibición AC Activación RhoA	Plaquetas humanas, cerebro, megacariocitos.
P2Y <sub>13</sub>	2MeSADP ≥ 2MeSATP > ADP >> ATP UTP y UDP inactivos	AR-C69931 > PPADS > Suramina 2MeSAMP MRS2211	G <sub>10</sub> PLCβ/IP <sub>3</sub> /Ca <sup>2+</sup> Inhibición AC	Bazo, cerebro, células gliales, páncreas, médula ósea, ganglios linfáticos, hígado, corazón, hueso.
P2Y <sub>14</sub>	UDP-glucosa > UDP-galactosa > UDP-Glucurónico > UDP-N-acetilglucosamina ATP, ADP, UTP y UDP inactivos	No conocido	G <sub>10</sub> Activación PLC	Placenta, tejido adiposo, estómago, intestino, cerebro, bazo, timo, corazón, pulmón.

ya se encuentran funcionales en pasos muy tempranos de la evolución, como por ejemplo en la raya *Raja erinacea*, sugiriendo que los receptores de nucleótidos están entre los más antiguos receptores extracelulares expresados en el reino animal (Dranoff y cols., 2000).

Los receptores P2Y poseen un tamaño que oscila desde los 328 aminoácidos del P2Y<sub>6</sub> hasta los 377 del P2Y<sub>2</sub>, con una masa molecular de entre 41 y 53 kDa, compartiendo entre ellos entre un 20 y un 50% de homología, en el caso de los receptores P2Y humanos (Shaver, 2001). Estructuralmente, los P2Y se pueden clasificar en receptores acoplados a proteínas G<sub>q</sub> (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub>) y acoplados a proteínas G<sub>i</sub> (P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>) (von Kugelgen, 2006).



**Figura 3. Estructura secundaria propuesta para el receptor P2Y<sub>12</sub>.** Los residuos implicados en la unión del ligando aparecen en negrita, mientras que los de color rojo indican la formación de puentes disulfuro. EL: dominio extracelular. TM: segmento transmembrana. Imagen tomada de (von Kugelgen, 2006).

Estos receptores poseen secuencias altamente conservadas en los dominios transmembrana 3, 6 y 7 que intervendrían de forma crítica en la unión del ligando. Esta unión sucedería de forma secuencial en varias etapas. Inicialmente el ligando se une en una conformación energéticamente favorable formada por los lazos extracelulares y los segmentos transmembrana más alejados que forman los dos sitios de meta-unión (MBS). El ligando pasa primero por el MBS-I, donde los residuos Thr47, Glu209 y Arg287 (tomando como modelo para estos estudios el receptor P2Y<sub>1</sub> humano) se ocupan de la unión de la adenina, la ribosa y los fosfatos, respectivamente. De ahí el ligando pasa al MBS-II donde intervienen los residuos Arg128, Asp204, Ser213, Thr222, Lys280 y Gln307, y finalmente pasan al sitio de unión principal donde los residuos Gln307 y Ser314 se encargan de la



unión de la adenina, y los residuos Arg12, Thr222, Lys280 y Arg310 se ligan a los grupos fosfato. La intervención de estos residuos permite rebajar la energía necesaria para la formación del complejo ligando-receptor (Moro y Jacobson, 2002; Costanzi y cols., 2004; Jacobson y cols., 2004; Ivanov y cols., 2006). En receptores como el P2Y<sub>12</sub> se ha demostrado la importancia de alguno de estos residuos en el funcionamiento y unión de agonistas y antagonistas al receptor, como los residuos Lys280 (TM7), Tyr259, H253 y Arg256 (TM6), que tendrían un papel clave en el reconocimiento del agonista y del antagonista RB2 (Hoffmann y cols., 2008).

Todos los receptores P2Y poseen cuatro residuos de cisteína en los lazos extracelulares y en el extremo N-terminal, que pueden formar uno o dos puentes disulfuro, y que están implicados en numerosas funciones. Por ejemplo, el puente formado entre el segmento transmembrana 3 y el lazo extracelular 2 se requiere para el correcto tráfico a la membrana del P2Y<sub>1</sub> humano (Hoffmann y cols., 1999), mientras que el P2Y<sub>12</sub> muestra un único puente disulfuro y dos cisteínas libres que pueden actuar como dianas para antitrombóticos que inactivan el receptor (Ding y cols., 2003). En los lazos extracelulares del P2Y<sub>2</sub> se encuentra también una secuencia de interacción con integrinas que es necesaria para el mantenimiento del receptor en un estado de alta afinidad (Weisman y cols., 2005).

Los receptores P2Y presentan un mayor grado de variabilidad en el extremo C-terminal y los lazos intracelulares, que regulan la interacción con las proteínas G. Cada receptor está asociado a una o varias proteínas G. Además de esto, algunas subtipos P2Y, como P2Y<sub>2</sub> o P2Y<sub>4</sub>, poseen en su extremo C-terminal y en el tercer bucle extracelular secuencias de serina/treonina que pueden ser dianas para quinasas asociadas a receptores acoplados a proteínas G y para la proteína quinasa C (PKC). Estas secuencias estarían implicadas en la desensibilización o internalización del receptor promovida por la presencia continuada del agonista (Otero y cols., 2000; Brinson y Harden, 2001; Flores y cols., 2005). Igualmente, aparecen dominios ricos en prolina de homología SH3 que intervienen en la transactivación de las vías de señalización activadas por los factores de crecimiento (Weisman y cols., 2005).

Constitutivamente o bajo determinadas situaciones los receptores P2Y pueden formar homo o heterodímeros, quizás para dotar de mayor estabilidad a su estructura. Un ejemplo es la homodimerización de P2Y<sub>1</sub> o de P2Y<sub>6</sub> como consecuencia de la exposición continuada al agonista, probablemente de forma previa a su internalización y renovación (Marchese y cols., 1999; D'Ambrosi

y cols., 2007; Choi y cols., 2008). También se han descrito homo-oligómeros para el P2Y<sub>4</sub> en varias neuronas del sistema nervioso central y periférico (D'Ambrosi y cols., 2006), y tanto este receptor como P2Y<sub>6</sub> muestran dominios apropiados para la interacción con otros receptores como los P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> y P2Y<sub>11</sub> (D'Ambrosi y cols., 2007). Igualmente, en líneas celulares HEK293 y 1321N1 de astrocitoma, se ha comprobado por coimmunoprecipitación la heterooligomerización de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>11</sub>, que estaría regulando la internalización del propio receptor P2Y<sub>11</sub> (Ecke y cols., 2008b). Además de los oligómeros entre receptores P2Y, éstos pueden interaccionar con otros receptores, como se ha descrito para el P2Y<sub>1</sub> y el receptor A1 de adenosina, que presenta un perfil farmacológico mixto, respondiendo a nucleótidos difosfato de adenina y siendo sensible a antagonistas del receptor A1, como el DPCPX (Yoshioka y cols., 2002; Yoshioka y Nakata, 2004).

#### 1.4.1.2. Señalización intracelular mediada por receptores P2Y.

Los receptores P2Y activan diversos mecanismos de señalización intracelular. Por un lado, los receptores P2Y<sub>1,2,4,6,11</sub> están acoplados principalmente a la PLC, a través de una proteína G<sub>q/11</sub> insensible a toxina pertúsica. Como resultado del acoplamiento a la PLC/IP<sub>3</sub>, los receptores P2Y producen incrementos en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> mediante la salida de calcio de reservorios intracelulares, y activan la PKC en las células que los expresan, poniendo en marcha así numerosas cascadas de señalización secundarias (Erb y cols., 2006), como la cascada de las MAP quinasas en astrocitos (Delicado y cols., 2005; Weisman y cols., 2012) y plaquetas (García y cols., 2007). Los receptores P2Y clonados más recientemente, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>, parecen estar relacionados mayoritariamente con la disminución de los niveles de AMPc por su acoplamiento a una proteína sensible a la toxina pertúsica G<sub>i/o</sub>, aunque el P2Y<sub>13</sub> y el P2Y<sub>14</sub> pueden, de modo adicional, producir incrementos de calcio (Abbracchio y cols., 2006; Erb y cols., 2006). Además, nuestro grupo ha descrito distintas vías de señalización acopladas al receptor P2Y<sub>13</sub> en neuronas granulares y astrocitos de cerebelo, como las MAP quinasas o la proteína GSK3, que se describirán con más detalle en el apartado 1.4.1.4.c.

Además de todas estas vías de señalización, en el sistema nervioso los receptores P2Y están igualmente acoplados a la modulación de canales iónicos, como canales dependientes de voltaje de Ca<sup>2+</sup> o K<sup>+</sup>, los receptores NMDA de glutamato, los propios receptores P2X y los receptores de vanilloides (Lechner y Boehm, 2004; Abbracchio y cols., 2006; Gerevich y cols., 2007).

#### **1.4.1.3. Características farmacológicas. Distribución de los receptores P2Y en el sistema nervioso.**

Farmacológicamente, los receptores P2Y se pueden clasificar atendiendo a la afinidad que muestran frente a los nucleótidos de adenina y uracilo. Aunque estas respuestas varían en potencia dependiendo de las especies, los receptores P2Y pueden dividirse en tres grupos. El primero está formado por los receptores P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub> y P2Y<sub>13</sub>, que son activados únicamente por nucleótidos difosfato, como el ADP, siendo el P2Y<sub>11</sub> el único que se activa por ATP y que solamente se ha clonado en humano (King y Townsend-Nicholson, 2008). Otro grupo lo forman receptores activados tanto por nucleótidos de adenina como de uracilo (receptores P2Y<sub>2</sub> y P2Y<sub>4</sub>), y por P2Y<sub>6</sub>, que es específico para pirimidinas. Un caso especial es el del P2Y<sub>14</sub>, activado por UDP-glucosa y por otros UDP-azúcares (Abbracchio y cols., 2006; von Kugelgen, 2006; Burnstock, 2007b; von Kugelgen y Harder 2011; Weismann y cols., 2012). La Tabla 3 resume las características farmacológicas de los subtipos de la familia P2Y clonados hasta el momento.

Estos receptores tienen una amplia distribución en todo el organismo (Tabla 3). Concretamente, en el sistema nervioso central, se ha descrito la expresión de la mayoría de los subtipos conocidos, mediando funciones muy importantes, como la regulación de la plasticidad sináptica, la liberación de neurotransmisores o la regulación de procesos de neurodegeneración y neuroregeneración (Burnstock, 2013).

En el cerebro humano se expresan abundantes niveles de ARNm de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2Y<sub>11</sub> en comparación con otros tejidos. El P2Y<sub>1</sub> se expresa principalmente en corteza, cerebelo, hipocampo y ganglios basales (Moore y cols., 2000; Moore y cols., 2001). Por el contrario, únicamente son detectables niveles bajos o moderados del mensajero de los receptores P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub> y P2Y<sub>6</sub> en cerebro humano (Moore y cols., 2001). El receptor P2Y<sub>12</sub> se localiza preferentemente en células gliales (Hollopeter y cols., 2001), al igual que el P2Y<sub>14</sub>, descrito en astrocitos de rata (Fumagalli y cols., 2003). Por último se ha descrito la presencia del receptor P2Y<sub>13</sub> en cerebelo, hipocampo, tálamo, sustancia negra o núcleo caudado (Communi y cols., 2001; Carrasquero y cols., 2005).

#### **1.4.1.4. Receptor metabotrópico P2Y<sub>13</sub>.**

Uno de los receptores de nucleótidos que va a ser objeto de estudio en la presente Tesis es el receptor metabotrópico P2Y<sub>13</sub>. En 2001, se clonó el receptor humano y se identificó en células de astrocitoma 1321N1. Fue previamente conocido como el receptor huérfano GPR86, y en 2004 en astrocitos de rata, como



un nuevo receptor de ADP filogenética y estructuralmente relacionado con el  $P2Y_{12}$  y con receptores de UDP-glucosa. Este receptor se encuentra distribuido en bazo, médula ósea, ganglios linfáticos, cerebro, hígado, páncreas, corazón y hueso (Communi y cols., 2001; Fumagalli y cols. 2004; Orriss y cols., 2010). Posteriormente, nuestro grupo identificó y caracterizó farmacológicamente el receptor  $P2Y_{13}$  por primera vez en el sistema nervioso, en astrocitos y en neuronas granulares de cerebelo de rata, como el receptor responsable de las respuestas de calcio inducidas por el agonista 2MeSADP que eran insensibles al antagonista del receptor  $P2Y_1$ , el MRS-2179. Además, este receptor  $P2Y_{13}$  aparece habitualmente coexpresado con el receptor  $P2Y_1$  en distintos tipos celulares (Hervás y cols., 2003; Carrasquero y cols., 2005).

#### *1.4.1.4.a) Características farmacológicas del receptor $P2Y_{13}$ .*

Este receptor en humano es activado por ADP y muy potentemente por 2MeSADP, mientras que el ortólogo de rata, presenta afinidades similares por los dos agonistas ADP y 2MeSADP, lo que permite también su diferenciación respecto al receptor  $P2Y_{12}$ . Entre sus antagonistas destacan el MRS-2211 y el MRS-2603, que actúan mucho más potentemente que el PPADS, un antagonista clásico de receptores  $P2X$  y  $P2Y$  (Kim y cols., 2005). Estos antagonistas son inactivos frente al  $P2Y_{12}$ , lo que hace más fácil su diferenciación, aunque el MRS-2603 también parece tener efecto sobre el  $P2Y_1$ . El cangrelor y el 2MeSAMP, que son antagonistas selectivos del  $P2Y_{12}$ , antagonizan también este receptor a ciertas concentraciones (Jantzen y cols., 1999). Como antagonistas no selectivos tenemos el RB2, suramina y PPADS.

#### *1.4.1.4.b) Funciones fisiológicas del receptor $P2Y_{13}$ .*

Como se ha mencionado anteriormente, el receptor  $P2Y_{13}$  se encuentra ampliamente distribuido por todo el organismo. A pesar de que este receptor no es tan conocido como otros receptores purinérgicos, en los últimos años se ha descubierto la gran importancia que tiene en diferentes tipos celulares y su involucración en posibles terapias para diversas enfermedades.

El receptor  $P2Y_{13}$  contribuye a la regulación de la liberación de ATP en los eritrocitos, promoviendo la reducción de la hipertensión y la prevención de la insuficiencia cardiaca (Wang y cols., 2005). También juega un papel muy importante en la regulación de la angiogénesis actuando en diversos tipos de células endoteliales microvasculares (Lyubchenko y cols., 2010).

La expresión del receptor  $P2Y_{13}$  también se encuentra en células

hematopoyéticas y partes del sistema inmune, tales como el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea. Además, en mastocitos, los antagonistas de este receptor favorecen desgranulación dando lugar a la reducción de reacciones alérgicas no deseadas (Communi y cols., 2001; Gao y cols., 2010).

También existen resultados que establecen el  $P2Y_{13}$  como una nueva diana para modular el transporte reverso del colesterol. Se demostró que este proceso no era sólo dependiente del nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL) en plasma sanguíneo, ya que en ratones deficientes de este receptor, la capacidad de absorción del colesterol mediado por HDL disminuyó considerablemente (Fabre y cols. 2010).

Recientemente, se ha propuesto el uso del antagonista del  $P2Y_{13}$ , el MRS-2211, para terapias contra diabetes, debido a que facilita la liberación de insulina (Amisten y cols., 2010; Chatterjee y cols., 2012). También frente a la osteoporosis, ya que la respuesta osteogénica *in vivo* ante una carga mecánica en ratones deficientes de este receptor era mayor que en ratones control (Wang y cols., 2013).

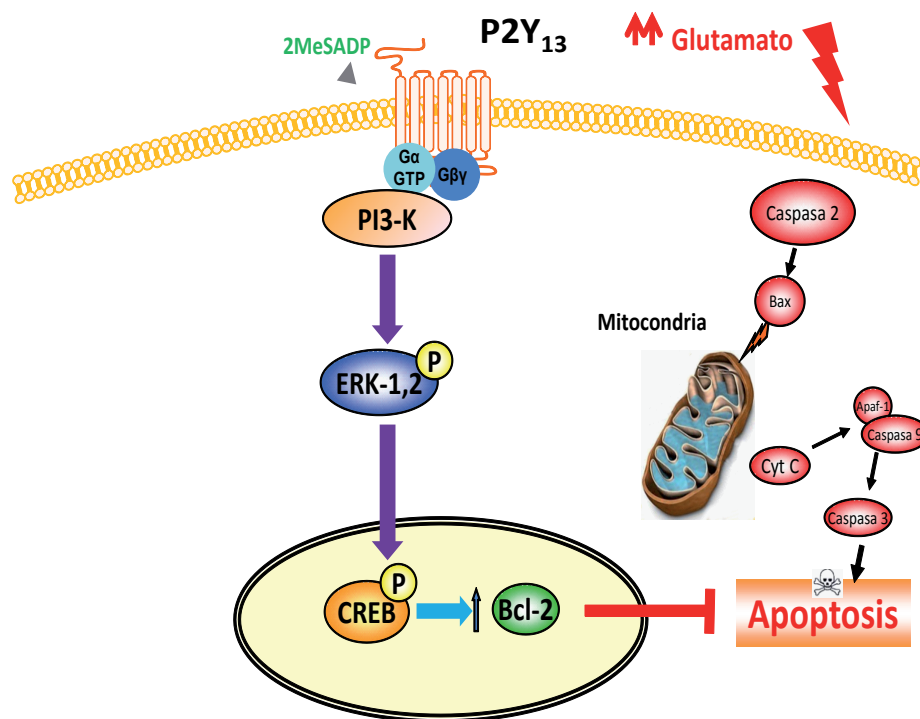
Finalmente, dentro del SNC, se han descrito importantes acciones para este receptor en trabajos de nuestro grupo en colaboración con otros laboratorios. En cultivos neuronales primarios de médula espinal, el receptor  $P2Y_{13}$  modula la actividad de los transportadores de glicina GLYT1 y GLYT2, por lo que estarían contribuyendo a la modulación de las respuestas noniceptivas y la sensibilización al dolor (Jiménez y cols., 2011). Este receptor, también juega un papel muy importante en la diferenciación neuronal, ya que su activación lleva a la supresión de la diferenciación en líneas celulares N2a, PC12 y MEB5, y a la inhibición del crecimiento axonal en neuronas de hipocampo (Yano y cols., 2012; del Puerto y col., 2012).

#### ***1.4.1.4.c) Señalización del receptor $P2Y_{13}$ en neuronas granulares de cerebelo. Implicación en neuroprotección y neurodegeneración.***

En nuestro grupo se ha descrito que la señalización del receptor  $P2Y_{13}$  en neuronas granulares de cerebelo de rata se encuentra acoplada a dos vías de señalización claves en el mantenimiento de la supervivencia celular, siendo una ellas la glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), y otra, la proteína quinasa activada por señales extracelulares (ERK1/2).

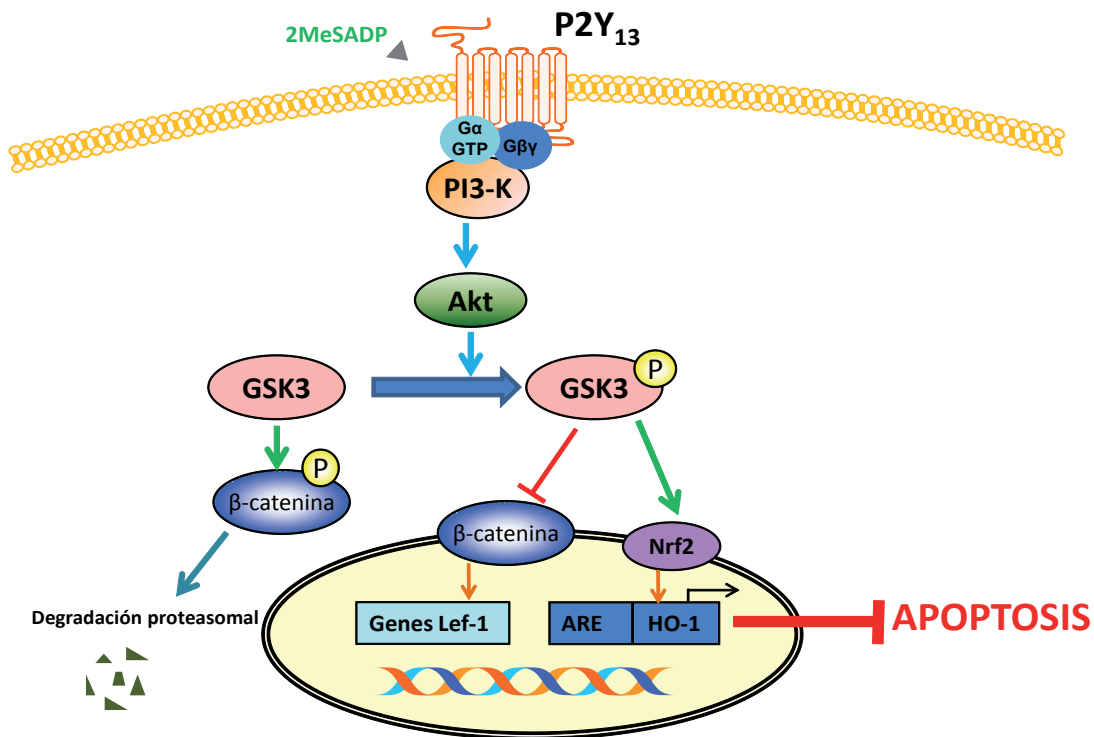
Por una parte, el receptor  $P2Y_{13}$  está acoplado a la activación de las proteínas ERK1/2 a través de manera dependiente de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), mediando un efector neuroprotector frente a la excitotoxicidad inducida por

glutamato que implica la activación del factor de transcripción CREB (Figura 4). Además, este receptor también es capaz de fosforilar la proteína GSK3, provocando de ese modo la inhibición de su actividad calatítica, a través de una vía dependiente de PI3K/Akt, permitiendo la estabilización y translocación al núcleo de un sustrato de la GSK3, el regulador transcripcional  $\beta$ -catenina, que está relacionado en respuestas de supervivencia celular (Figura 5) (Ortega y cols., 2008; Ortega y cols., 2011).



**Figura 4. Esquema resumen de la señalización mediada por el 2MeSADP hacia ERK1/2 frente a estrés citotóxico.** La activación del receptor P2Y<sub>13</sub> induce a través la vía de PI3K la fosforilación de ERK1/2 provocando de ese modo la activación de factores de transcripción que impiden la apoptosis frente a la excitotoxicidad producida por el glutamato.

También en cultivos de neuronas granulares, y en colaboración con el grupo del Dr. Antonio Cuadrado, se ha visto que el receptor P2Y<sub>13</sub>, derivado de su acción sobre la vía de la GSK3, está implicado en la estabilización y translocación nuclear del factor de transcripción Nrf2, y la expresión del factor citoprotector hemoxigenasa-1 (HO-1). Este efecto es responsable de la neuroprotección por parte de P2Y<sub>13</sub> frente al estrés oxidativo inducido por el tratamiento con agua oxigenada (Figura 5) (Espada y cols., 2010).



**Figura 5. Esquema resumen de la señalización mediada por el 2MeSADP hacia GSK3 en neuronas granulares de cerebelo.** La activación del receptor P2Y<sub>13</sub> induce, a través de una vía mediada por PI3K/Akt la fosforilación e inhibición de la GSK3, lo que la disocia del complejo que forma con β-catenina impidiendo su degradación vía proteasoma y permitiendo a β-catenina, estabilizarse en el citosol y translocarse al núcleo. Paralelamente, la fosforilación de GSK3 provoca la activación del factor de transcripción Nrf2 ante la citotoxicidad provocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> impidiendo la apoptosis celular.

#### 1.4.2. Receptores ionotrópicos P2X.

Los receptores P2X son canales iónicos insertados en la membrana plasmática que se activan por la unión del ATP extracelular y una vez activados permiten el paso selectivo de cationes de pequeño tamaño (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup>) (North, 2002; Coddou y cols., 2011). Se expresan en todo el organismo, mediando multitud de procesos que van desde la transmisión sináptica hasta la coagulación sanguínea. Tienen un papel destacado en la transmisión sináptica rápida entre neuronas y en la transmisión neuromuscular en el músculo liso, donde el ATP actúa como uno de los neurotransmisores principales (Edwards y cols., 1992; Sneddon y cols., 2000). Hasta la fecha se han identificado siete subunidades P2X diferentes, denominadas P2X1 a P2X7, que se ensamblan en forma de canales homo- o heterotriméricos (Nicke y cols., 1998; Vial y cols., 2004b). También han sido identificados los genes que codifican para cada subunidad. Tanto la subunidad P2X4 como la P2X7 se localizan en el mismo cromosoma (brazo largo del cromosoma 12 humano), al igual que les ocurre a las subunidades P2X1 y

P2X5 (brazo corto del cromosoma 13). Sin embargo el resto de subunidades se localizan en cromosomas diferentes. El descubrimiento de nuevas isoformas de cada una de estas subunidades ha aumentado la diversidad de esta familia de receptores. Cabe destacar, por ejemplo, las isoformas identificadas como consecuencia del procesamiento diferencial en cerebelo de rata, cóclea y pituitaria, del receptor P2X2 (Simon y cols., 1997; Housley y cols., 1998; Lynch y cols., 1999). Aunque la mayoría de las variantes no son capaces de formar canales activos por sí mismas, su expresión en los tejidos pone de manifiesto la posibilidad de que la heterogeneidad de los receptores P2X *in vivo* sea mayor de la esperada.

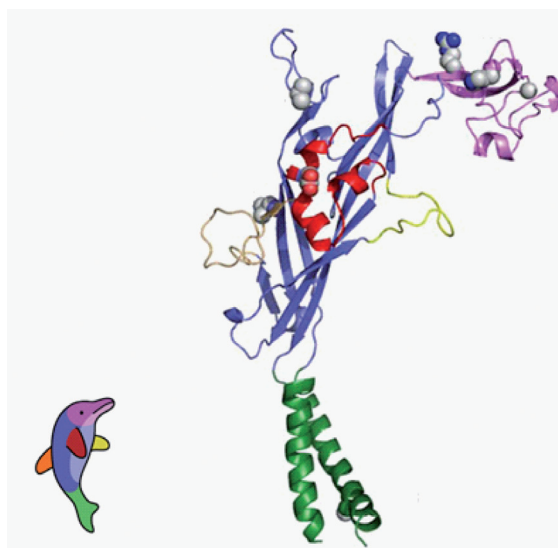
#### 1.4.2.1. Características estructurales y oligomerización.

Los receptores P2X constituyen una familia estructuralmente bien diferenciada dentro del grupo de canales iónicos activados por ligando (North, 1996). Las subunidades P2X varían entre los 379 aminoácidos del receptor P2X6 a los 595 del P2X7. Poseen dos regiones transmembrana (TM1 y TM2) y los extremos N- y C- terminales citosólicos, con motivos de unión a proteínas quinasas. Mientras que el extremo N-terminal tiene un tamaño uniformemente corto (24-31 aa) en todas las subunidades, el extremo C-terminal es muy variable en secuencia y tamaño: muy corto en los receptores P2X1, 3, 4 y 6, intermedio en los P2X2 y 5 e inusualmente grande en la subunidad P2X7, con más de 200 aa y un dominio hidrofóbico extra. Este hecho sugiere que el extremo carboxi-terminal podría conferir propiedades específicas a cada receptor. Por otro lado, entre el 50 y el 70% de la estructura de estas subunidades lo forma un bucle extracelular situado entre los dos segmentos transmembrana. Este dominio posee alrededor de 280 aminoácidos, 93 de los cuales se encuentran altamente conservados en, al menos, seis de las siete subunidades P2X (Vial y cols., 2004, Evans, 2009).

Recientemente, Gouaux y su grupo han descrito la arquitectura de los receptores P2X basándose en la cristalización de la estructura del receptor P2X4 (Hattori y Gouaux, 2012). Como se muestra en la Figura 6, cada subunidad presenta una estructura en forma de delfín con las hélices transmembrana y la región extracelular semejantes a la cola y el cuerpo, respectivamente (Kawate y cols., 2009). La arquitectura central del cuerpo extracelular está caracterizada por dos dominios de  $\beta$ -lámina que otorgan rigidez y resistencia a cambios conformacionales. El dominio de la cabeza se define por tres  $\beta$ -láminas antiparalelas y una  $\alpha$ -hélice (Kawate y cols., 2009). En esta región extracelular se encuentran también altamente conservados 10 residuos de cisteína que forman series de puentes disulfuro y así contribuyen a la estabilización de la estructura

terciaria (Ennion y Evans, 2009), así como numerosos sitios de glicosilación, necesarios para la inserción de las proteínas en la membrana plasmática y para la regulación de la potencia del ligando.

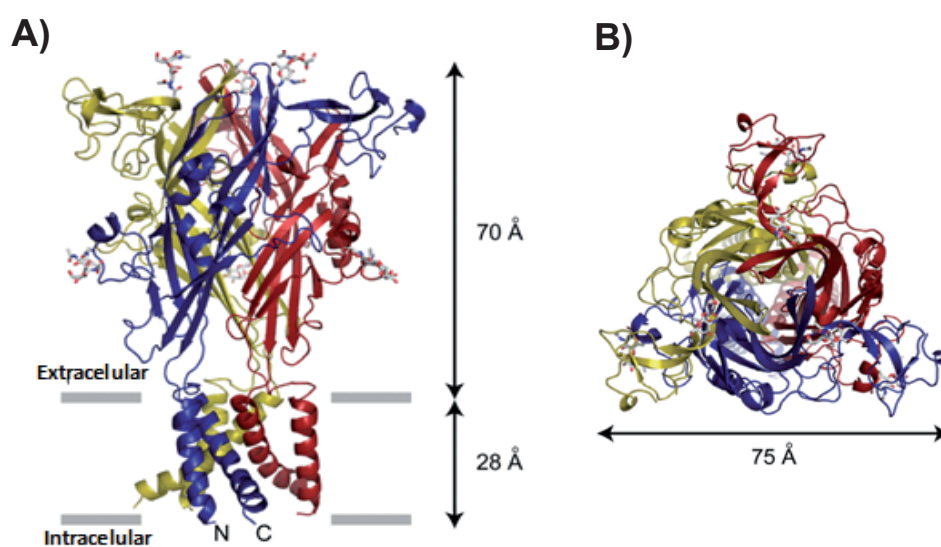
Los dos segmentos transmembrana (TM) que presentan las subunidades P2X no son capaces, por sí mismos, de formar un poro iónico, motivo por el que las distintas subunidades se asocian como homo- o heterotrómeros para formar un canal funcional (Nicke y cols., 1998; Aschrafi y cols., 2004; Nagaya y cols., 2005). El trímero posee un dominio extracelular muy extenso que sobresale aproximadamente 70 Å sobre el plano de la membrana, y una región transmembrana de 28 Å (Figura 7). El canal está formado por seis hélices TM, dos por cada subunidad que lo compone. Los segmentos TM1 forman múltiples interacciones con las hélices TM2 de la misma subunidad, pero también con los TM1 y TM2 de las otras subunidades. Así, las hélices TM1 presentan la mayoría de contactos con la bicapa lipídica, mientras que las TM2 cubren el poro iónico (Gonzales y cols., 2009; Browne y cols., 2010). La entrada y salida del canal están formadas principalmente por residuos hidrofóbicos e incluyen aproximadamente dos vueltas de las  $\alpha$ -hélices de los TM2 (Kawate y cols., 2009). En la región extracelular, las  $\beta$ -láminas centrales interaccionan con las subunidades adyacentes, mientras que no se producen contactos entre ellas en la base de dicha región. Esta conformación podría permitir a las hélices TM el movimiento hacia una conformación abierta ante la interacción de la región extracelular con el ligando (Kawate y cols., 2009).



**Figura 6. Modelo estructural de las subunidades P2X humanas.** Los colores en la estructura de la subunidad P2X representan las diferentes partes del delfín: en verde la cola, en azul el cuerpo, la cabeza en rosa, la aleta dorsal en naranja y las aletas laterales en rojo y amarillo. Adaptado de (Kawate y cols., 2009).



En este sentido, Gouaux y su grupo proponen que el sitio de unión del ATP a los receptores P2X se localiza en las ranuras que quedan entre las distintas subunidades (Kawate y cols., 2009; Hattori y Gouaux, 2012). Estas ranuras están formadas por residuos conservados que se han descrito implicados en la apertura del canal dependiente de ATP (Jiang y cols., 2000a; Ennion y Evans, 2002; Roberts y Evans, 2006; Marquez-Klaka y cols., 2007). Los receptores homoméricos están compuestos por subunidades idénticas, aunque la interacción entre las subunidades P2X5 y P2X6 presenta mayor dificultad (King y cols., 2000; Wildman y cols., 2002; Barrera y cols., 2005). Además de estos homo-oligómeros, las distintas subunidades P2X pueden interaccionar entre sí formando hetero-oligómeros (Torres y cols., 1999), aunque este ensamblaje no se produce aleatoriamente entre cualquier subunidad P2X.



**Figura 6. Modelo estructural de las subunidades P2X humanas.** Los colores en la estructura de la subunidad P2X representan las diferentes partes del delfín: en verde la cola, en azul el cuerpo, la cabeza en rosa, la aleta dorsal en naranja y las aletas laterales en rojo y amarillo. Adaptado de (Kawate y cols., 2009).

Hasta la fecha se han identificado varios receptores heteroméricos que serían responsables de las respuesta a ATP encontradas en algunos tejidos como el P2X1/P2X2 en neuronas del ganglio cervical; el P2X1/P2X4 en músculo liso, microglía y células del sistema inmune; el P2X1/P2X5 en el asta ventral de la médula espinal; el P2X2/P2X3 en neuronas sensoriales; el P2X2/P2X6 en espinas dendríticas; el P2X2/P2X5 en neuronas del núcleo mesencefálico del trigémino; y el P2X4/P2X6 en hipocampo de rata (Khanh-Tuoc Lê y cols., 1998; Torres y cols., 1998; Rubio y Soto, 2001; Calvert y Evans, 2004; Xiang y Burnstock, 2005b; Kobayashi y cols., 2005; Roberts y cols., 2006; Abbracchio y cols., 2009; Compan y cols., 2012). La heteromerización de la subunidad P2X7 aún no está claramente

establecida ni descartada. Durante mucho tiempo se pensó que únicamente formaba homo-oligómeros, sin embargo, en el año 2007 se propuso su intervención en heterómeros funcionales con la subunidad P2X4 (Guo y cols., 2007). Por el contrario, estudios posteriores indican que estos trímeros no son estables o no representan un porcentaje significativo en los modelos estudiados (Nicke, 2008).

Los receptores P2X no aparecen insertados en la membrana celular de forma aleatoria, donde pueden aparecer agrupados o localizados en diferentes partes de la célula. A modo de ejemplo, respuestas inducidas por el receptor P2X2 se registraron de las terminales pre-sinápticas de las interneuronas hipocámpales, pero no en el soma neuronal (Khakh y cols., 2003). Dado que la membrana celular no es homogénea, los receptores pueden agruparse junto a las proteínas de membrana en microdominios. Un posible mecanismo para mantener las proteínas y moléculas de señalización juntas, puede ser su inclusión en balsas lipídicas ("lipid rafts"), como sucede para los receptores P2X1, P2X3 y P2X7 (Vacca y cols., 2004; Vial y Evans, 2005; Gonnord y cols., 2009). Sin embargo, otros receptores, como el P2X2 y P2X4, no parecen estar asociados a lipid rafts en neuronas granulares del cerebelo (Vacca y cols., 2004).

#### **1.4.2.2. Características funcionales y regulación de los receptores P2X.**

Las propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores P2X dependen de las subunidades que componen el canal. Los diferentes receptores P2X pueden ser clasificados en función de su perfil de respuesta, su afinidad por agonistas y antagonistas y su sensibilidad ante la regulación por calcio, magnesio, protones o zinc (Tabla 4). En los receptores heteroméricos las características pueden venir determinadas por una de las subunidades que lo forman, o ser una combinación de las características de las distintas subunidades integrantes del receptor. Sin embargo, es muy usual que en el mismo tejido o tipo celular se coexpresen diversas subunidades complicando el estudio de las mismas.

La activación de los receptores P2X produce la entrada rápida (milisegundos) y no selectiva de cationes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  o  $\text{K}^{+}$  (Bo y cols., 2003). La permeabilidad relativa para cada uno de estos iones varía en función de la subunidad P2X implicada, aunque también puede modificarse dependiendo de su regulación. Los receptores P2X1 y P2X3 son los que más rápido pierden la respuesta en presencia continuada del agonista (desensibilización), cayendo dicha respuesta en un 90% en 1-2 segundos. Las respuestas de los otros receptores P2X son mucho más sostenidas, situándose en el extremo contrario el receptor P2X7, cuya respuesta se mantiene durante minutos (North, 2002). En algunos



**Tabla 4. Clasificación de los receptores P2X homoméricos.** Los datos reflejados en la tabla han sido obtenidos de (Norenberg y Illes, 2000; Khakh y cols., 2001; North, 2002; King y Towsend-Nicholson, 2003); Illes y Ribeiro 2004; (Burnstock 2007b); Chambers y cols., 2010; Chen y cols., 2010; Coddou y cols., 2011; Burnstock y cols., 2012).

Receptor	EC <sub>50</sub> (ATP)	Potencia de agonistas (EC <sub>50</sub> )	Antagonistas (IC <sub>50</sub> )	Modulación por iones	Desensibilización	Distribución mayoritaria
P2X1	0,1 µM	ATP = 2MeSATP ≥ Ap <sub>5</sub> A ≥ α,β-meATP > BzATP > Ap <sub>5</sub> A	NF449 > Ip <sub>5</sub> I > TNP-ATP > Ip <sub>5</sub> I > MRS2159 > PPADS (rango nM) Suramina = PPADS (rango µM)	H <sup>+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↓ Cd <sup>2+</sup> ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, músculo liso, plaquetas, ganglios simpáticos.
P2X2	5 µM	2MeSATP ≥ ATP >> Ap <sub>4</sub> A > ATPγS > BzATP ADP inactivo	RB-2 = NF279 = PPADS > Suramina (rango µM) NF770 > NF776 > NF778	H <sup>+</sup> ↑ Zn <sup>2+</sup> ↑ Cu <sup>2+</sup> ↑ Ca <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, células cromafines, músculo liso, retina.
P2X3	1,3 µM	2MeSATP ≥ ATP = α,β-meATP > Ap <sub>5</sub> A > ADP	TNP-ATP > MRS2257 = A317491 > MRS2159 = PPADS (rango nM) NF279 = NF449 > Ip <sub>5</sub> I ≥ Suramina > NF023 > RB 2 (rango µM) A317491, NF110, rojo fenol	Zn <sup>2+</sup> ↑ H <sup>+</sup> ↓ Ca <sup>2+</sup> ↓	Rápida	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, neuronas sensoriales.
P2X4	4 µM	ATP > 2MeSATP α,β-meATP y ADP inactivos Potenciación por Ivermectina, Propofol y Cibacron blue	TNP-ATP > BBG (rango mM) Fenolftaleína	H <sup>+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↑	Lenta	Cerebro, médula espinal, ganglios simpáticos, testículos, colon.
P2X5	0,4 µM	ATP = 2MeSATP = Ap <sub>4</sub> A > α,β-meATP ADP inactivo	PPADS > TNP-ATP > Suramina > RB-2 (rango µM)	Zn <sup>2+</sup> ↑ H <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Ganglio del trigémino, médula espinal, células proliferativas de la piel, timo, vejiga.
P2X6	0,6 µM	2MeSATP > ATP = α,β-meATP ADP inactivo	TNP-ATP > PPADS Insensible a Suramina	H <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↑	Lenta	Ganglios simpáticos, cerebro, médula espinal.
P2X7	400 µM	BzATP >> ATP 2MeSATP > αβ-meATP = βγ-meATP ATPγS y ADP inactivos	A-740003 ≥ A-438079 (rata, humano) BBG (rango nM) (rata) PPADS = TNP-ATP (rango nM) KN-62 (rango nM) (humano) A804598 = AZ11645373 (rango nM)	H <sup>+</sup> ↓ Mg <sup>2+</sup> ↓ Cu <sup>2+</sup> ↓ Zn <sup>2+</sup> ↓ Ca <sup>2+</sup> ↓	Lenta	Ganglios de retina y cóclea, células inmunes, cerebro, médula espinal, páncreas y piel.

casos la desensibilización sucede como consecuencia de la constitución de una forma cerrada del receptor unido al agonista, requiriéndose varios minutos de lavado para recobrar la funcionalidad completa (Rettinger y Schmalzing, 2003). Esta recuperación puede regularse por muchos factores, incluyendo el agonista empleado (Sokolova y cols., 2004) o el calcio (Wildman y cols., 2002).

Los receptores P2X están modulados alostéricamente por protones extracelulares, cationes divalentes y varios metales, como el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$  (Tabla 4) (Virginio y cols., 1999; North, 2002; Coddou y cols., 2011). Kawate y cols. han propuesto recientemente la presencia de 4 sitios de unión de cationes di- y trivalentes, uno en el centro de la región extracelular, los otros 3 en la periferia del receptor (un sitio por cada subunidad), y una regulación negativa del receptor por parte de estos iones (Kawate y cols., 2009).

A su vez, los receptores P2X pueden modularse a través de diversas acciones sobre su dominio intracelular. Las fosforilaciones en serina, treonina o tirosina en determinadas zonas de este dominio regulan de forma importante la actividad de los receptores (Boue-Grabot y cols., 2000; Toth-Zsamboki y cols., 2002). Por ejemplo, en la zona de transición entre el dominio TM2 y el C-terminal del receptor P2X7 se localiza una tirosina (Tyr343), cuya defosforilación tras la activación del canal reduce la duración de la respuesta (Becker y cols., 2008).

La principal consecuencia de la activación de los receptores P2X es un incremento transitorio en la concentración intracelular de calcio libre, que despolariza la membrana. Esto induce la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que se suma a la entrada de calcio a través del propio canal P2X. El incremento del calcio citosólico dispara posteriormente una serie de eventos intracelulares, como activación o inhibición de proteínas quinasas, entre las que se encuentran la calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII) (Diaz-Hernandez y cols., 2004a; Diaz-Hernandez y cols., 2006; Leon y cols., 2006), MAP quinasas (MAPK), proteína quinasa C (PKC) (Erb y cols., 2006) o glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) (Diaz-Hernandez y cols., 2008; Gomez-Villafuertes y cols., 2009; Ortega y cols., 2009); así como la liberación vesicular de neurotransmisores, como acetilcolina (Diaz-Hernandez y cols., 2002a), glutamato (Gualix y cols., 2003) o GABA (Gomez-Villafuertes y cols., 2001).

#### 1.4.2.3. Características farmacológicas.

Las herramientas farmacológicas disponibles a la hora de discriminar entre los diferentes receptores P2X son en muchos casos muy limitadas, e incluso existen agonistas y antagonistas que, a las mismas concentraciones, pueden actuar

tanto sobre receptores P2X como P2Y. En la Tabla 4 se resumen los principales agonistas y antagonistas empleados en la caracterización farmacológica de los receptores P2X.

En general pueden distinguirse dos grandes grupos en la familia de los receptores P2X. Los receptores P2X1 y P2X3 se caracterizan por presentar una elevada afinidad por el ATP. Además son activados por el análogo estructural del ATP,  $\alpha,\beta$ -meATP, sufren una desensibilización rápida, inactivándose totalmente en menos de 1 s de exposición a ATP y una recuperación lenta. El resto de receptores, P2X2, P2X4, P2X5, P2X6 y P2X7, muestran menor afinidad por el ATP, insensibilidad al  $\alpha,\beta$ -meATP (excepto el P2X6) y desensibilización menos marcada (North, 2002; Gever y cols., 2006; Coddou y cols., 2011). Las curvas de dosis-respuesta para los receptores P2X expresados en sistemas heterólogos muestran que la  $EC_{50}$  para el ATP varía desde concentraciones submicromolares ( $EC_{50} \sim 0,1 \mu M$ , P2X1, 3), hasta el micromolar bajo ( $EC_{50} = 10 \mu M$ , P2X2, 4, 6). De todos los receptores homoméricos P2X, el constituido por las subunidades P2X7 es el que presenta menor afinidad para el ATP, con una  $EC_{50}$  elevada ( $400 \mu M$ ) (Ver Tabla 4) (North, 2002; Gever y cols., 2006).

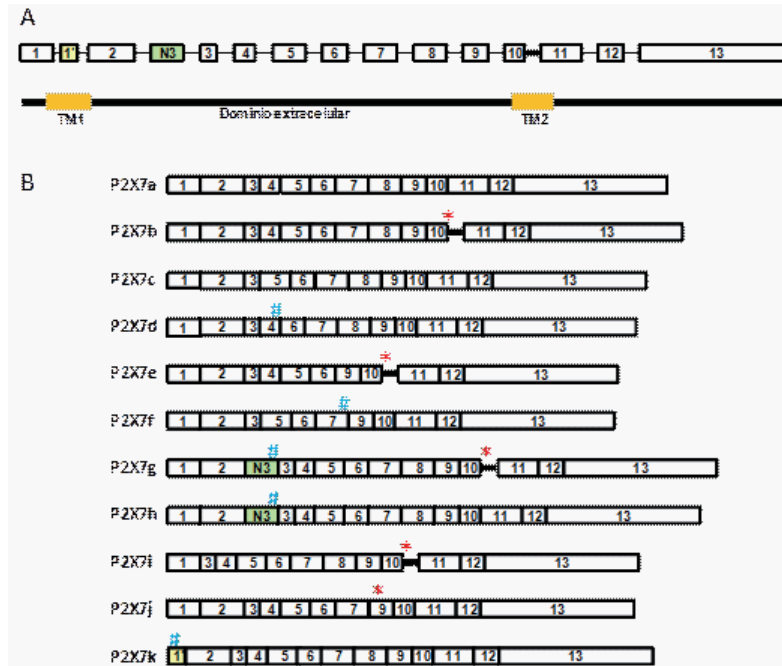
#### 1.4.2.4. Receptor ionotrópico P2X7.

Además del receptor P2Y<sub>13</sub>, otro receptor que ha sido objeto de estudio en la presente Tesis, fue el ionotrópico P2X7. El grupo de Gary Buell y Annmarie Surprenant lo aisló y lo clonó de los macrófagos humanos, en los cuales la respuesta a ATP en ausencia de magnesio inducía la apertura de un poro citolítico. Este supuesto receptor que respondía a ATP fue denominado en un principio como P2Z. El estudio de la secuencia del receptor clonado demostró que tenía una estructura similar a los otros miembros de la familia P2X, con dos hélices transmembranarias y como característica diferencial la presencia de un largo extremo C terminal y una baja afinidad por el ATP (Surprenant y cols., 1996; North, 2002).

El gen del receptor P2X7 humano se localiza en el cromosoma 12 (12q24). Inicialmente se describió conteniendo 13 exones que codificaban para una proteína de 595 aminoácidos (Buell y cols., 1998), sin embargo, hoy en día se conoce la existencia de dos nuevos exones: el exón 1' en rata, localizado en la región intrónica entre el exón 1 y el exón 2 (Nicke y cols., 2009), y en humano el exón N3, localizado en la región intrónica entre el exón 2 y el 3 (Cheewatrakoolpong y cols., 2005) (Figura 8).

Hasta la fecha se han descrito 10 variantes de splicing (P2X7b-P2X7k)

(Figura 8), 9 en humano (P2X7b-P2X7j) y una en rata y ratón (P2X7k), aunque sólo de 4 de estas variantes se han detectado a nivel proteico (P2X7b, P2X7h, P2X7j y P2X7k), (Cheewatrakoolpong y cols., 2005; Feng y cols., 2006; Nicke y cols., 2009), y sólo dos de ellas parecen ser funcionales (P2X7b y P2X7k) (Cheewatrakoolpong y cols., 2005; Nicke y cols., 2009). La variante P2X7a es la proteína completa.

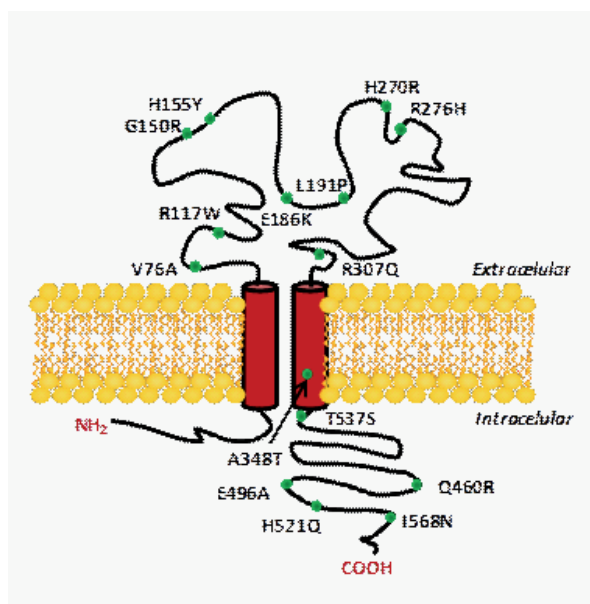


**Figura 8. Estructura del gen del receptor P2X7 (A) y las variantes con procesamiento alternativo (B).** A. Estructura propuesta del gen P2X7. Los exones están numerados e indicados como cajas. Los intrones se representan como líneas horizontales entre los exones. Bajo la estructura genómica se muestra la estructura del ARN mensajero. TM1 y TM2: segmentos transmembrana 1 y 2. B. Organización de los exones en el ARNm de las variantes con procesamiento alternativo del gen del receptor P2X7 aislados hasta el momento. Los nuevos codones de inicio se representan como # y los nuevos codones de stop como \*. Datos obtenidos de (Cheewatrakoolpong y cols., 2005; Feng y cols., 2006; Nicke y cols., 2009).

Además, se han identificado multitud de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen del receptor P2X7 humano (Figura 9). La mayoría de estos SNPs confieren la pérdida de función de algunos eventos activados por el receptor P2X7, como por ejemplo pérdida de sensibilidad para su correcta activación (Gu y cols., 2001; Wiley y cols., 2003; Gu y cols., 2004; Shemon y cols., 2006; Roger y cols., 2010), aunque algunos de ellos también inducen ganancia de función (Cabrini y cols., 2005; Denlinger y cols., 2006; Roger y cols., 2010; Stokes y cols., 2010). Adicionalmente se han identificado varios SNPs en el gen del receptor P2X7 que están asociados con trastornos del ánimo como los trastornos bipolares (Barden y cols., 2006; Lucae y cols., 2006; McQuillin y cols., 2009).

Como se ha mencionado previamente, el extremo C-terminal del receptor P2X7 posee una longitud extrema, que alcanza los 240 aminoácidos y posee

numerosas secuencias de interacción con otras proteínas. Entre ellas destacan: la tirosina-fosfatasa  $\beta$  (RPTP $\beta$ ), la  $\alpha$ -actinina 4, la  $\beta$ -actina, la supervillina, 3 proteínas de choque térmico (Hsp90, Hsp70 y Hsc71), la fosfatidilinositol 4 quinasa (PI4K), la guanilato quinasa P55 asociada a membrana (MAGuK), las miosinas IIA y Va, GRK3, dinamina, clatrina, caveolina 1 y calmodulina (Kim y cols., 2001; Feng y cols., 2005; Barth y cols., 2007; Roger y cols., 2008; Gu y cols., 2009). También se encuentran en el extremo C-terminal de este receptor dominios SH2 (Surprenant y cols., 1996) y una secuencia de unión a lípidos similar a la secuencia de unión a lipopolisacárido encontrada en otras proteínas, que parece estar involucrada en el transporte a membrana y en la funcionalidad del receptor (Denlinger y cols., 2003; Lenertz y cols., 2011). Además, Becker y cols. han propuesto que la interacción física observada entre el receptor y el dominio C-terminal conecta señales del exterior e interior de la célula controlando así la apertura y cierre del canal (Becker y cols., 2008).



**Figura 9. Localización de algunos polimorfismos de un solo nucleótido no silenciosos en el receptor P2X7.** Datos obtenidos de (Stokes y cols., 2010; Roger y cols., 2010).

#### **1.4.2.4.a) Características farmacológicas del receptor P2X7.**

La estimulación del receptor con agonistas durante un breve periodo de tiempo (< 10 segundos) conduce a una apertura rápida y reversible del canal, que permite el paso de iones Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Surprenant y cols., 1996). Además, la activación aguda del receptor desencadena una serie de respuestas celulares como la liberación de citoquinas, proliferación celular o activación de caspasas y la consiguiente apoptosis celular (North, 2002; Verhoef y cols., 2003; Kahlenberg

y Dubyak, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, los receptores P2X7 homoméricos son activados por elevadas concentraciones de ATP ( $EC_{50}$  400  $\mu$ M) y por BzATP, siendo este último significativamente más potente (20  $\mu$ M) que el ATP (Young y cols., 2007). Sin embargo el BzATP no es un agonista selectivo del receptor P2X7, puesto que también activa los receptores P2X1 y P2X3 (Bianchi y cols., 1999), y el receptor metabotrópico P2Y<sub>13</sub> en astrocitos de cerebelo de rata (Carrasquero y cols., 2009).

Los antagonistas más empleados, suramina y PPADS, no son selectivos para este receptor y lo bloquean con baja afinidad y de forma no competitiva (Jacobson y cols., 2002). El Brilliant Blue G (BBG) es un antagonista más potente y selectivo, sobre todo en rata ( $IC_{50}$  ~ 10-15 nM) y en ratón ( $IC_{50}$  100 nM), mientras que en humano su efectividad es mucho menor ( $IC_{50}$   $\geq$  10  $\mu$ M) (Jiang y cols., 2000b; Young y cols., 2007). Este antagonista se une al receptor por un sitio de unión diferente al del ATP y posee un ratio lento de disociación (Michel y cols., 2007).

En 2006 los laboratorios Abbot generaron dos nuevos antagonistas selectivos para esta subunidad, el A-438079, un derivado tetrazol que bloquea de forma competitiva y reversible los receptores P2X7, y el A-740003, una cianoguanidina que actúa de forma competitiva sobre los receptores, ambos con acción tanto en rata como en humano, en el rango nanomolar alto (Honore y cols., 2006; Nelson y cols., 2006). Además, se han desarrollado dos nuevos antagonistas de los receptores P2X7 humanos y de rata, uno derivado de pirazolacetamida (Chambers y cols., 2010) y el otro derivado de cicloheptanol clorobenzamida, ambos con una  $IC_{50}$  en el rango nanomolar (Chen y cols., 2010).

El P2X7 es el receptor que menos se desensibiliza y sus corrientes se mantienen en presencia de ATP y BzATP durante aplicaciones prolongadas (hasta minutos). Además, las aplicaciones de larga duración a veces van acompañadas de incrementos en la amplitud de la corriente (Surprenant y cols., 1996; Virginio y cols., 1997; North, 2002).

#### **1.4.2.4.b) Señalización del receptor P2X7.**

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de estos receptores induce la apertura rápida y reversible del canal, lo que permite el paso de iones  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  y  $K^{+}$ . Los cambios producidos en la concentración intracelular de potasio como consecuencia de dicha activación provocan la activación de caspasa-1 y la liberación de IL-1 $\beta$  (Kahlenberg y Dubyak, 2004; Ferrari y cols., 2006).

La activación de los receptores P2X7 y la consecuente entrada de calcio a



la célula también se ha asociado con otras vías de señalización entre las que se incluyen la fosfolipasa D (Humphreys y Dubyak, 1996), Nf- $\kappa$ B (Ferrari y cols., 1997a), GSK3 (Diaz-Hernandez y cols., 2008; Ortega y cols., 2009; Ortega y cols., 2010) y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) (Aga y cols., 2002; Pfeiffer y cols., 2004; Lenertz y cols., 2009; Ortega y cols., 2011). Diversos estudios demuestran que las diferentes MAPKs afectadas por la activación del receptor P2X7 varían dependiendo del modelo de estudio. Por ejemplo, en células de astrocitoma humano 1321, la activación del receptor P2X7 recombinante media el incremento en las ERK1/2 (Gendron y cols., 2003), mientras que no ocurre así en células humanas diferenciadas THP-1 (Donnelly-Roberts y cols., 2004).

Además, el incremento del calcio citoplásmico inducido por la activación del receptor P2X7 es importante para la liberación de neurotransmisores, en un proceso dependiente de calmodulina. En esta cascada de señalización, el calcio activa la calmodulina, que activa a su vez la calmodulina quinasa II (CaMKII). Esta quinasa fosforila la sinapsina de la superficie de las vesículas sinápticas, provocando la liberación de las vesículas del citoesqueleto, de modo que puedan fusionarse con las zonas activas de la terminal presináptica y liberar así su contenido de neurotransmisores (Lin y cols., 1990; Leon y cols., 2006).

Por otro lado, en nuestro grupo se ha descrito por primera vez el acoplamiento del receptor P2X7 a la activación de la proteína quinasa D (PKD) en un proceso independiente de la entrada de calcio en astrocitos de rata en cultivo (Carrasquero y cols., 2010).

En último lugar cabe destacar que la estimulación del receptor P2X7 induce su propia redistribución en la membrana y el citosol. Este proceso se asocia con cambios en el estado de fosforilación del receptor y con un aumento en la interacción del receptor con GRK3 (receptor quinasa acoplado a proteína G),  $\beta$ -arrestina-2 y dinamina (Feng y cols., 2005).

#### ***1.4.2.4.c) El receptor P2X7 en el sistema nervioso y su función neuronal. Implicaciones en neuroprotección y neurodegeneración.***

El receptor P2X7 se expresa en una gran variedad de tejidos y se asocia a múltiples funciones. Inicialmente se clonó en macrófagos (Buisman y cols., 1988; Di Virgilio, 1995) y se describió su expresión, junto con los receptores P2X1 y P2X4, en una gran variedad de células del sistema inmune, incluyendo linfocitos B y T, monocitos, eritrocitos, macrófagos, microglía y también en osteoclastos (Burnstock y Knight, 2004). Así, este receptor participa en el proceso inflamatorio por medio de la liberación de IL-1 $\beta$  en macrófagos y microglía activada, lo que

puede causar la apoptosis en las células circundantes (Ferrari y cols., 2006; Di Virgilio, 2007).

Durante mucho tiempo se postuló que el receptor P2X7 estaba ausente de las neuronas, siendo expresado únicamente por células no neurales del sistema nervioso como microglía, linfocitos, macrófagos y astrogliá (Collo y cols., 1997). Gracias a estudios que han utilizado técnicas de hibridación *in situ* y análisis por RT-PCR, se ha detectado la presencia del ARNm del receptor P2X7 en diversas áreas del SNC como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, la médula espinal, el cerebelo, el estriado, el tálamo e hipotálamo y el hipocampo, participando en numerosas e importantes funciones (Yu y cols., 2008b). Además, cada vez son más los trabajos que ponen de manifiesto la expresión funcional de estos receptores en neuronas participando en numerosas e importantes funciones. Nuestro grupo ha contribuido de manera importante al estudio de la caracterización y distribución del receptor P2X7 en el SNC en distintos tipos de preparaciones, como terminaciones sinápticas y distintos modelos celulares como astrocitos, neuronas granulares de cerebelo, neuronas de hipocampo y de corteza (Hervas y cols., 2003; Miras-Portugal y cols., 2003; Hervas y cols., 2005; Sanchez-Nogueiro y cols., 2005; Leon y cols., 2006; Diaz-Hernandez y cols., 2008; Marin-Garcia y cols., 2008; Sanchez-Nogueiro y cols., 2009; Carrasquero y cols., 2009; Ortega y cols., 2009).

Recientemente en nuestro grupo, se ha identificado que el factor de transcripción Sp1 juega un papel fundamental en la regulación transcripcional del receptor P2X7 implicado en el crecimiento, diferenciación y muerte en células N2a, en astrocitos y en neuronas corticales (García-Huerta y cols., 2012).

Cabe destacar la significativa presencia del receptor P2X7 en las terminales nerviosas de distintas partes del SNC dado que más del 50% de éstas presentan marcaje con anticuerpos frente a dicha subunidad, y es posible, además, medir respuestas presinápticas en ellas al estimularlas con agonistas específicos del receptor P2X7 (Miras-Portugal y cols., 2003; Hervas y cols., 2005). Esta localización tan específica apoya una de las funciones más importantes de estos receptores, la modulación de la liberación de neurotransmisores, como el glutamato o el GABA (Atkinson y cols., 2004; Papp y cols., 2007; Sperlagh y cols., 2007; Leon y cols., 2008).

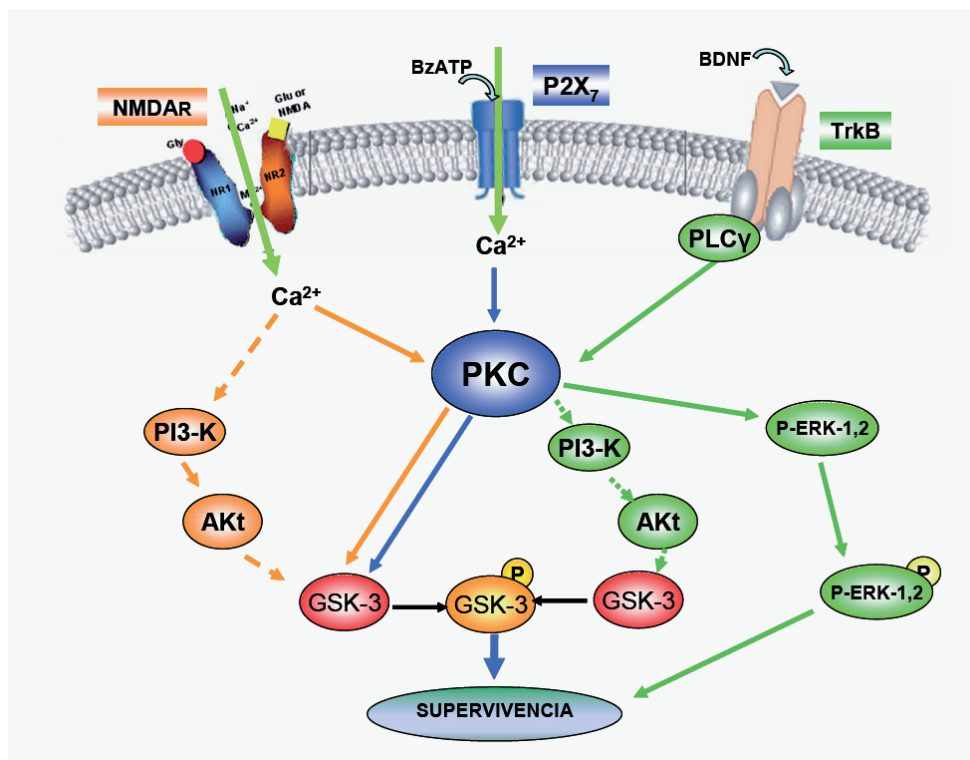
Los receptores P2X7 se han descrito como agentes involucrados en procesos neurodegenerativos regulando la concentración intracelular de calcio, la liberación y procesamiento de la IL-1 $\beta$ , activación de caspasas y liberación



de glutamato en condiciones patológicas como inflamación, daño mecánico, isquemia y estrés (Solle y cols., 2001; Le Feuvre y cols., 2002; Chessell y cols., 2005; Sperlagh y cols., 2006). También median la producción de 2-araquidonilglicerol y endocannabinoides en astrocitos y microglía, contribuyendo en los procesos neuroprotectores (Witting y cols., 2004; Witting y cols., 2006). Además, la estimulación de los receptores induce fosforilación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc) lo que genera un efecto inhibitorio de la inflamación en la microglía (Potucek y cols., 2006).

Es significativo el interés que existe en el papel del receptor P2X7 como diana terapéutica en los trastornos del SNC, ya que se ha propuesto el empleo de antagonistas específicos del P2X7 en enfermedades agudas y crónicas del sistema nervioso, como la lesión en la médula espinal (Peng y cols., 2009), isquemia (Melani y cols., 2006; Arbeloa y cols., 2012), lesión cerebral traumática (Kimbler y cols., 2012), enfermedad de Alzheimer (León-Otegui y cols., 2011; Díaz-Hernández y cols., 2012), la enfermedad de Huntington (Díaz-Hernández y cols., 2009), epilepsia (Engel y cols., 2012) y depresión (Sperlagh y cols., 2012).

A diferencia de estos efectos, en las neuronas granulares de cerebelo de rata, nuestro grupo ha descrito que la activación del receptor P2X7 puede tener efectos neuroprotectores en este modelo celular. Por una parte, a través del acoplamiento a una vía dependiente de CaMKII hacia la activación de las ERK1/2, protege frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato. En esta misma línea, para el receptor P2X7 se describió una nueva vía de señalización, acoplada a la fosforilación e inhibición de la proteína GSK3, de manera dependiente de PKC, e independiente del eje PI3K/Akt, que es característico de los factores de crecimiento. De esta manera, la inhibición de la GSK3 mediada por el receptor P2X7, mediaba un efecto neuroprotector frente a la apoptosis inducida por la inhibición farmacológica de la PI3K, que simula las condiciones de privación de factores tróficos en estas neuronas. Además, en este mismo modelo de estímulo apoptótico, el receptor P2X7 presentaba un efecto sinérgico con los receptores de BDNF y de NMDA en la supervivencia neuronal. La interacción entre los receptores P2X7 y NMDA se producía a nivel de la señalización de calcio y de la fosforilación de la GSK3 (Figura 10) (Ortega y cols., 2009; Ortega y cols., 2010, Ortega y cols., 2011).



**Figura 10. Esquema resumen de la interacción del P2X7 con los receptores de BDNF y NMDA.** El receptor P2X7 comparte con el receptor de NMDA la vía mediada por PKC hacia la fosforilación de la GSK3. Esta vía alternativa se pone en marcha para el receptor de NMDA cuando la vía canónica dependiente de PI3K/Akt no está funcional, que es el caso de la inhibición farmacológica de la PI3K. El receptor de BDNF posee igualmente un punto de inicio común en su señalización, que es la PKC, fosforilando por un lado a la GSK3 vía PI3K/Akt, mientras que por otro fosforila y activa a las ERK1/2, que intervienen de forma crucial en la supervivencia. Imagen tomada de (Ortega, 2009).

## 2. EL CEREBELO.

El cerebelo es una zona de gran importancia dentro del encéfalo. Está presente desde los vertebrados más antiguos y, aunque ha ido evolucionando, su estructura, ordenación y conexiones de las neuronas entre distintos tipos neuronales no ha variado. En un principio se pensó que el cerebelo tenía la única función, aunque muy importante, de suavizar, dar continuidad y armonía al movimiento y postura corporal. Estas acciones se realizarían por medio de la integración y procesamiento de la información sensorial que llega de la periferia y la coordinación para ajustar correctamente el movimiento según esta información. Actualmente se sabe que el cerebelo participa también en la memoria a corto plazo, la cognición superior, planificación y realización de tareas, control de impulsos, mantenimiento de la atención y el habla. Además sus alteraciones podrían estar asociadas con algunas enfermedades como el autismo, ataxia y esquizofrenia (Fatemi y cols., 2012; O'Halloran y cols., 2012).

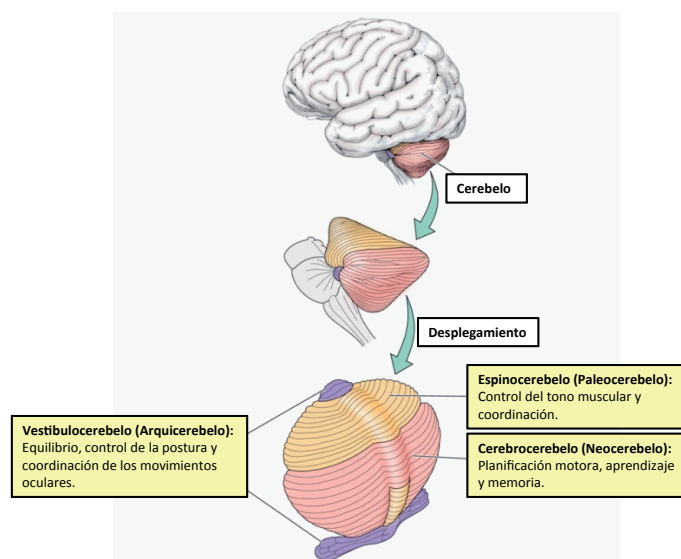
### **2.1. Anatomía del cerebelo.**

Anatómicamente, el cerebelo se encuentra situado sobre el tronco del encéfalo apoyado sobre los pedúnculos cerebelosos (superior, medio e inferior), por los que se conecta al resto del cerebro y a través de los cuales circulan las vías aferentes y eferentes del cerebelo. En mamíferos, el cerebelo está formado por una sucesión de láminas o folia de disposición transversal que cruzan la línea media sin discontinuidad, de modo que, desplegadas, ocuparían una superficie considerable.

Dos fisuras horizontales profundas, la fisura primaria y la fisura posterolateral dividen al cerebelo en lóbulos: el lóbulo anterior (paleocerebelo) y posterior (neocerebelo) y el lóbulo flóculonodular o arquicerebelo, respectivamente. Otras fisuras poco profundas subdividen los lóbulos anteriores en varios lobulillos (del I al X). En el plano longitudinal dos surcos crean una franja central denominada vermis, dejando los hemisferios cerebelosos a los lados. Éstos comprenden a su vez una región intermedia y una región lateral externa.

Cada porción del cerebelo tiene una especialización funcional, determinada por las conexiones de entrada y salida. El lóbulo flóculonodular o arquicerebelo es la parte filogenéticamente más antigua y se relaciona de manera recíproca con el sistema vestibular, interviniendo en el mantenimiento de la postura corporal y los movimientos oculares. Por otro lado, los lóbulos anterior y posterior están involucrados en el control de los movimientos corporales, existiendo en

ambos una segregación transversal de las conexiones. El vermis y la parte más próxima de los hemisferios (zona intermedia), constituyen la región denominada espinocerebelo. Reciben información visual, auditiva y somatosensorial de la cabeza y las partes proximales del cuerpo, a través de la médula espinal y el tronco encefálico. Se encargan de controlar la musculatura axial, la postura y la locomoción (Figura 11).



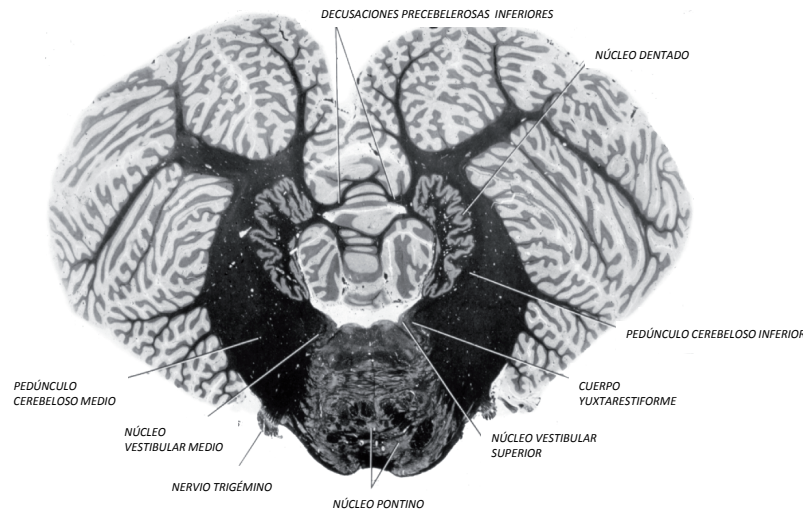
**Figura 11. Localización del cerebelo con respecto a otras estructuras del SNC y subdivisiones funcionales del cerebelo (vista longitudinal).** Imagen adaptada de (Watson y Breedlove 2012).

Por último, la región externa de los hemisferios, más desarrollada en el lóbulo posterior en paralelo con el gran desarrollo de la corteza cerebral en mamíferos, se denomina también cerebrocerebelo. Recibe aferencias corticales y de la médula espinal, proyectando, a través del núcleo dentado y el tálamo, sobre la corteza motora y premotora. De este modo, el cerebrocerebelo se ocupa de la planificación y coordinación de distintos grupos musculares para la realización de movimientos precisos y de alto grado de complejidad, así como de la comparación entre las órdenes motoras procedentes de la corteza cerebral con su resultado motor (Figura 11) (Blanks, 1988).

## **2.2. Histología y citoarquitectura del cerebelo.**

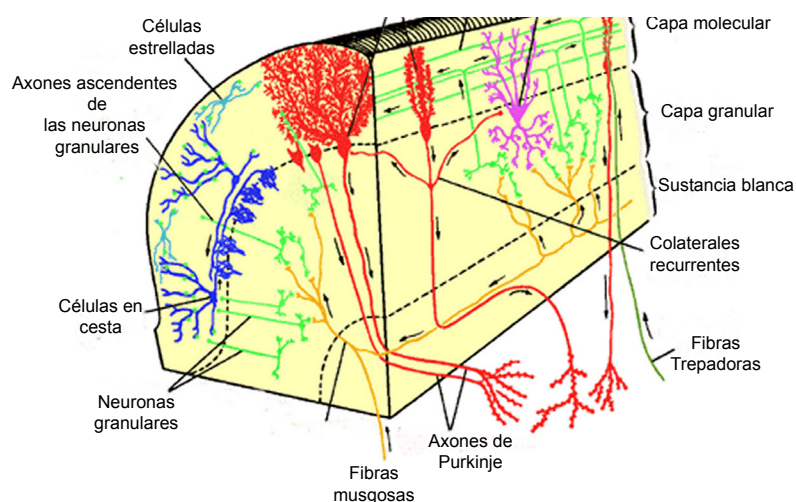
Histológicamente el cerebelo está formado por una capa externa de materia gris denominada corteza cerebelosa y una zona más interna de materia blanca (Figura 12) (Sultan y Glickstein, 2007).

La corteza cerebelosa se divide en tres capas, que de la superficie al interior se denominan capa molecular, de Purkinje y granular.



**Figura 12. Vista sagital del cerebelo.** La sustancia gris se dispone en superficie, donde forma la corteza cerebelosa. La sustancia blanca se localiza en la parte interna, envolviendo por completo a los núcleos profundos. Imagen adaptada de (Sultan y Glickstein 2007).

En el exterior se sitúa la capa molecular. En esta capa se encuentra el árbol dendrítico de las neuronas de Purkinje y los axones de las neuronas granulares, formando las fibras paralelas que hacen sinapsis a su paso con las neuronas de Purkinje que encuentran en el trayecto. También podemos hallar en esta capa numerosas interneuronas inhibitorias: las células estrelladas y las células en cesta, que extienden sus axones hacia capas más internas. Las células estrelladas establecen sinapsis con las dendritas distales de las células de Purkinje mientras que las células en cesta “envuelven” los cuerpos de éstas (Figura 13).

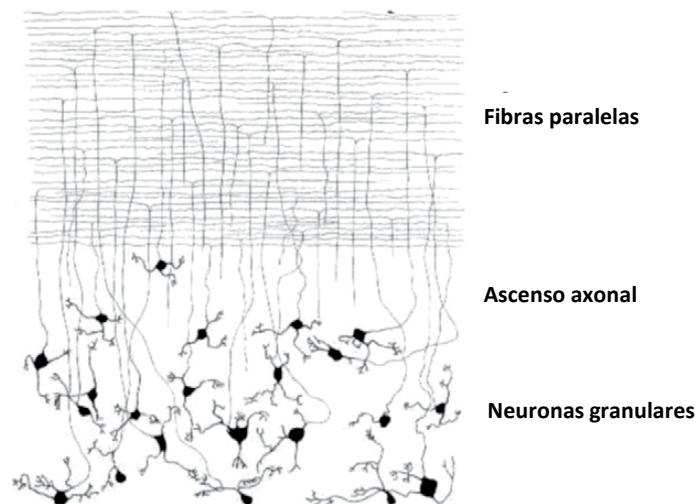


**Figura 13. Organización general de la corteza cerebelosa.** En el esquema se puede observar una circunvolución cerebelosa en eje transversal y longitudinal (izq. y dcha. respectivamente). Se puede observar la disposición de los principales tipos neuronales cerebelares, así como la formación de las fibras paralelas y de las fibras aferentes trepadoras y musgosas. Imagen adaptada de (Kandel y cols., 2000).



Por debajo de esta capa más externa se sitúa la capa de células de Purkinje o capa intermedia, que alberga, principalmente los cuerpos de estas neuronas, que se disponen de forma ordenada y cuyos axones descienden hacia la materia blanca y núcleos profundos constituyendo la única vía eferente del cerebelo.

Por último, la zona más interna del cerebelo se conoce como capa granular, formada principalmente por las pequeñas y numerosísimas células granulares. Los axones de estas neuronas ascienden y se bifurcan para formar las fibras paralelas de la capa molecular (Figuras 13 y 14). Sus dendritas, 4-5 por célula, hacen sinapsis en las terminaciones engrosadas o rosetas de las fibras musgosas donde, además, confluyen los axones de las células de Golgi, conformando los llamados glomérulos cerebelosos. En la capa granular existen, además, dos tipos neuronales poco conocidos en sus aspectos electrofisiológicos, las células de Lugaro, a las que se supone una función similar a las de Golgi, y las células en cepillo, que mediante las fibras musgosas establecerían contactos con las células granulares (Schmahmann y Pandya, 1997; D'Angelo y cols., 2011).

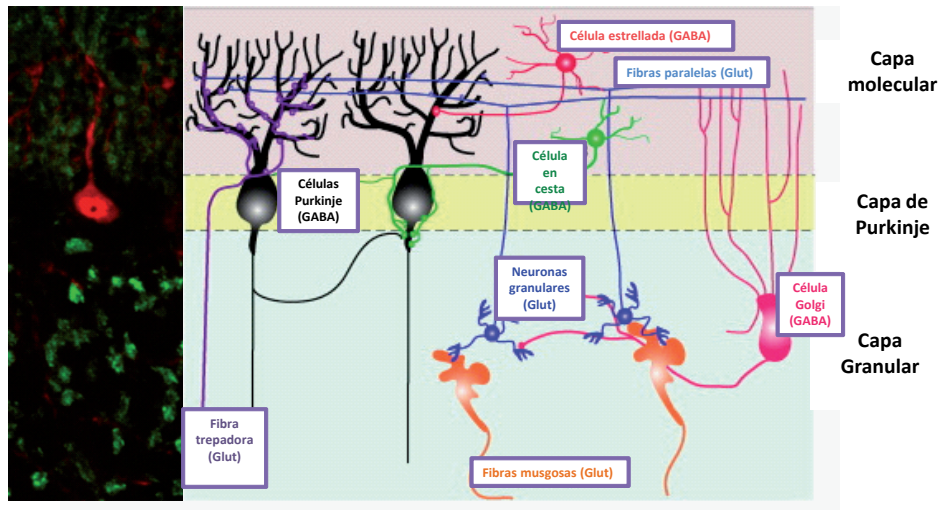


**Figura 14. Imagen de las neuronas granulares en el momento de su descubrimiento.** Esta imagen representa los principales elementos celulares de la corteza cerebelosa revelado por tinción de Golgi a finales del siglo XVIII. Esta imagen muestra las células granulares, representando las dendritas y los axones ascendentes que se bifurcan en fibras paralelas. Imagen adaptada de (Van Gehuchten, 1891).

La corteza cerebelosa contiene también numerosas células gliales entre las que destacan las células epiteliales de Golgi o glía de Bergmann, que envuelven a las neuronas de Purkinje y actúa de guía durante la migración de las células granulares. Además, encontramos otros tipos de células gliales, astrocitos y oligodendrocitos, a los que se les ha dado no solo un papel de soporte y mantenimiento del desarrollo de la corteza cerebelosa, sino también, una intervención directa en el circuito neuronal del cerebelo (Ito, 1984).

### 2.3. Circuito neuronal cerebeloso, vías aferentes y eferentes.

La información llega al cerebelo por medio de tres tipos de fibras: musgosas, trepadoras y monoaminérgicas (Figura 15), que constituyen dos grandes vías aferentes que llegan a las neuronas de Purkinje, mientras que cuenta solo con una única vía eferente formada por los axones de estas mismas neuronas.



**Figura. 15. Circuito de neurotransmisión de la corteza cerebelosa.** En el esquema se muestran los diferentes neurotransmisores que participan en el circuito cerebeloso. El ATP podría liberarse junto con otros neurotransmisores como el GABA, glutamato, noradrenalina o serotonina. Imagen adaptada de (Chédotal, 2010).

Las vías aferentes pueden llegar de modo directo a través de las fibras trepadoras, o indirecto, desde las fibras musgosas por vía de las neuronas granulares. La estimulación reiterada de las fibras trepadoras sobre las neuronas de Purkinje genera una despolarización prolongada que se traduce en espigas complejas, formadas por una espiga inicial de gran amplitud seguida de un conjunto de potenciales de acción de baja amplitud y alta frecuencia (De Zeeuw y cols., 1998). En contraste, las fibras paralelas producen potenciales de acción sencillos y breves o espigas simples (Martínez y col., 1971). En un plazo más o menos largo, la despolarización inducida en la neurona de Purkinje por las fibras trepadoras puede disminuir la eficacia post-sináptica de las fibras paralelas. Este fenómeno se conoce como “long term depression” (LTD) o inhibición a largo plazo y juega un importante papel en el aprendizaje motor.

A esta integración de señales aferentes hay que sumarle la modulación inhibitoria de la señal por las interneuronas. Como resultado, la neurona de Purkinje envía una señal que será más o menos intensa, pero de naturaleza inhibitoria. Esta capacidad integradora y moduladora que ocurre en el cerebelo

es la base de su papel en la coordinación, regulación y ajuste a varios niveles.

La vía eferente, por su parte se proyecta finalmente sobre las neuronas de los núcleos profundos cerebelares y vestibulares, siendo ésta una innervación puramente inhibitoria mediada por el neurotransmisor GABA. Al mismo tiempo, esta vía eferente envía colaterales axónicas recurrentes que inhiben, a su vez, a las células de Purkinje, estrelladas y en cesta contiguas creando así un potente lazo inhibitorio (Figura 15) (Sotelo, 2010).

## **2.4. Avances en el conocimiento de las funciones del cerebelo.**

El conocimiento de las funciones en las que está involucrado el cerebelo se ha ido incrementando a medida que han evolucionado las técnicas de estudio. Así pues, aparte de la función asignada en la coordinación del movimiento, se ha podido comprobar que el cerebelo está activo en gran cantidad de actividades que no guardan relación con la actividad motora (Schmahmann, 2004; Allen y cols., 2001).

El cerebelo participa en el aprendizaje de las tareas motoras por medio del mecanismo de internalización de las subunidades GluR2 de los receptores de AMPA conocida como “depresión a largo plazo” (LTD) (Ito, 2002). Las alteraciones en el cerebelo también están asociadas a trastornos cognitivos y afectivos (Exner y cols., 2004) debido a la interrupción de los circuitos de comunicación con la corteza cerebral. Los individuos afectados de autismo presentan un volumen y estructura anormal del cerebelo, lo que puede afectar a la conexión de los circuitos entre el cerebelo y el cerebro, alterando los mecanismos de aprendizaje (Herbert, 2006; Rogers y cols., 2013). Igualmente alteraciones en la estructura del cerebelo pueden estar asociadas al desarrollo de la esquizofrenia. Otras alteraciones, como la ataxia espinocerebelar están también relacionadas con el cerebelo, debido a la ruptura que se produce entre las conexiones aferentes y eferentes del córtex prefrontal y estructuras subcorticales, entre las que se encuentra el propio cerebelo (Alekseeva y cols, 2005).

Por lo tanto, y más allá de las funciones que inicialmente se asignaban al cerebelo, éste cobra cada vez más fuerza en el estudio e investigación de determinadas enfermedades y en el campo de la neurociencia conductual.

## **2.5. La neurona granular en el cerebelo.**

Las neuronas granulares se identificaron a finales del siglo XIX, al tiempo que salían a la luz los primeros estudios sobre la organización histológica y celular



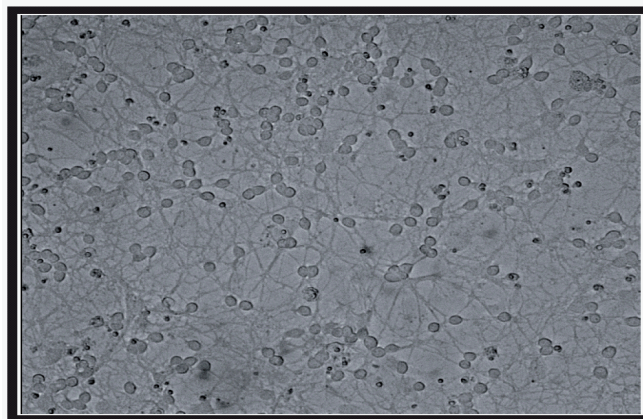
de la corteza cerebelosa (Obersteiner, 1880; Athias, 1897). Estas investigaciones desembocaron unos años después en los trabajos de Santiago Ramón y Cajal, que describió con gran precisión y belleza, utilizando tinciones de Golgi, las transformaciones que experimentan los distintos constituyentes de la corteza cerebelosa durante su migración y desarrollo (Ramón y Cajal, 1911; 1960). Desde entonces han sido numerosos los estudios que, confirmando aquellas elegantes descripciones, han tenido por objeto el desarrollo de la neurona granular.

Las células granulares del cerebelo son pequeñas neuronas con un soma de tamaño entre 6 y 10  $\mu\text{m}$ , con un núcleo denso, que constituyen el tipo neuronal más abundante del cerebro (del orden de  $10^{11}$  en humanos) y el 90% de las neuronas cerebelares. En la arquitectura del cerebelo ocupan una posición central, siendo la principal fuente de inervación hacia las neuronas de Purkinje con las que forman una red sináptica ortogonal perfectamente organizada y eficaz.

### **2.5.1. La neurona granular de cerebelo en cultivo.**

Las neuronas granulares, debido a su desarrollo posnatal y a la viabilidad de estas células en cultivo, son un excelente modelo para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares relacionados con la supervivencia/apoptosis y con la neuroprotección/ neurodegeneración tanto *in vivo* como *in vitro* (Contestabile, 2002).

Los cultivos de neuronas granulares (Figura 16) están muy bien establecidos, y la modificación de ciertos parámetros en estos cultivos supone una herramienta vital para el estudio de la apoptosis. El requerimiento más importante dentro de estos parámetros para el mantenimiento de las neuronas granulares es la despolarización crónica de las células con concentraciones superiores a 20 mM de  $\text{K}^+$ , usualmente de 25 mM. En presencia de las concentraciones fisiológicas de  $\text{K}^+$  (5 mM), las células entran en apoptosis (Balazs y cols., 1988). Esta necesidad de mantener un estado de excitación mantenida en las neuronas granulares parece mimetizar las conexiones que se establecen *in vivo* en las sinapsis excitadoras con las fibras musgosas, mientras las neuronas granulares se están diferenciando. Estas condiciones permiten el mantenimiento de ciertos niveles de calcio en el interior de la célula, que evitan la apoptosis (Contestabile, 2002).



**Figura 16. Neuronas granulares de cerebelo en cultivo.** La imagen tomada con un objetivo 20X de contraste de fases muestra neuronas granulares en día 11 de cultivo, destacándose la compleja red de prolongaciones axodendríticas establecida entre los somas neuronales, así como la pureza de este tipo de cultivo celular, superior al 95%.

### 3. PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas o MAPKs) son una familia de serina-treonina quinasas que regulan procesos celulares tan importantes como el crecimiento celular, proliferación, diferenciación, y apoptosis. Sin embargo, la desregulación de la actividad de las MAP quinasas, está implicada en diferentes procesos patológicos entre los que se incluyen la inflamación, transformación oncogénica e invasión tumoral. Entre los miembros de la familia de las MAP quinasas, son los mitógenos, factores de crecimiento y esteroides de forbol, los que frecuentemente activan la ruta de las ERK1/2. Por otro lado, los estímulos de estrés y los procesos inflamatorios constituyen el principal desencadenante de las cascadas de la Quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y la p38-MAPK (Junttila y cols., 2008).

Las cascadas de señalización de las MAP quinasas se organizan en módulos individuales, que se inician por estímulos extracelulares que inciden a través de receptores específicos, y transmiten la señal a distintos tipos de mediadores intracelulares que se van activando mediante de procesos de fosforilación de manera secuencial (MAPKKK→MAPKK→MAPK). Las MAP quinasas fosforilan finalmente a sus dianas en residuos de Ser/Thr que van seguidos por una prolina, presentando tanto sustratos citosólicos como nucleares. En este sentido sus dianas nucleares incluyen importantes factores de transcripción, y de esta manera impactan en el programa genético celular y el control de decisiones, como la proliferación celular, en el caso del módulo de las ERK1/2, y el balance supervivencia/apoptosis o diferenciación, como es a menudo el caso de las rutas activadas por JNK y p38 (Figura 17). Por otro lado, también regulan importantes funciones al actuar sobre dianas citosólicas, entre las que se encuentran proteínas relacionadas con la migración celular, hipertrofia, transducción sensorial, respuestas metabólicas y muchas otras (Shi y cols., 2006; Boutros y cols., 2008).

#### **3.1. Proteínas ERK1/2 (quinasas reguladas por señalización extracelular).**

Esta cascada de señalización está constituida por dos quinasas, ERK1 y 2 (ERK1/2), también conocidas como p42 y p44, respectivamente. Como se ha indicado anteriormente, se activan generalmente por mitógenos y factores de crecimiento. Normalmente responden, pero no de forma exclusiva, a la activación de receptores tirosina quinasa, así como a receptores acoplados a proteínas G. Dicha ruta está asociada a procesos como el crecimiento celular, proliferación y supervivencia. Muchas de las señales que activan la ruta de

las ERK1/2 son iniciadas por la activación de la proteína Ras al unirse a una proteína con actividad GTPasa en la membrana plasmática. Este proceso provoca seguidamente la activación de las proteínas Raf, como A-Raf, B-Raf y Raf-1 (MAPKKK). La fosforilación de las proteínas Raf induce la activación de MEK1/2 (MAPKK), que finalmente fosforilará y activará a las proteínas ERK1/2 (MAPK). Una vez activada la proteína ERK1/2, ésta puede translocarse al núcleo para proceder a la activación de factores de transcripción tales como *c-Fos*, *ATF-2*, *Elk-1*, *c-Jun*, *c-Myc* y *Ets-1*. Además, también se encuentran entre sus sustratos diversos tipos de quinasas tanto citoplasmáticas como nucleares, como es el caso de MNK1, MNK2, MAPKAP-2, RSK y MSK1,2 (Figura 17) (Roux y cols., 2004; Zebisch y cols., 2007).

### **3.2. Proteínas JNK (quinasas c-Jun N-terminal).**

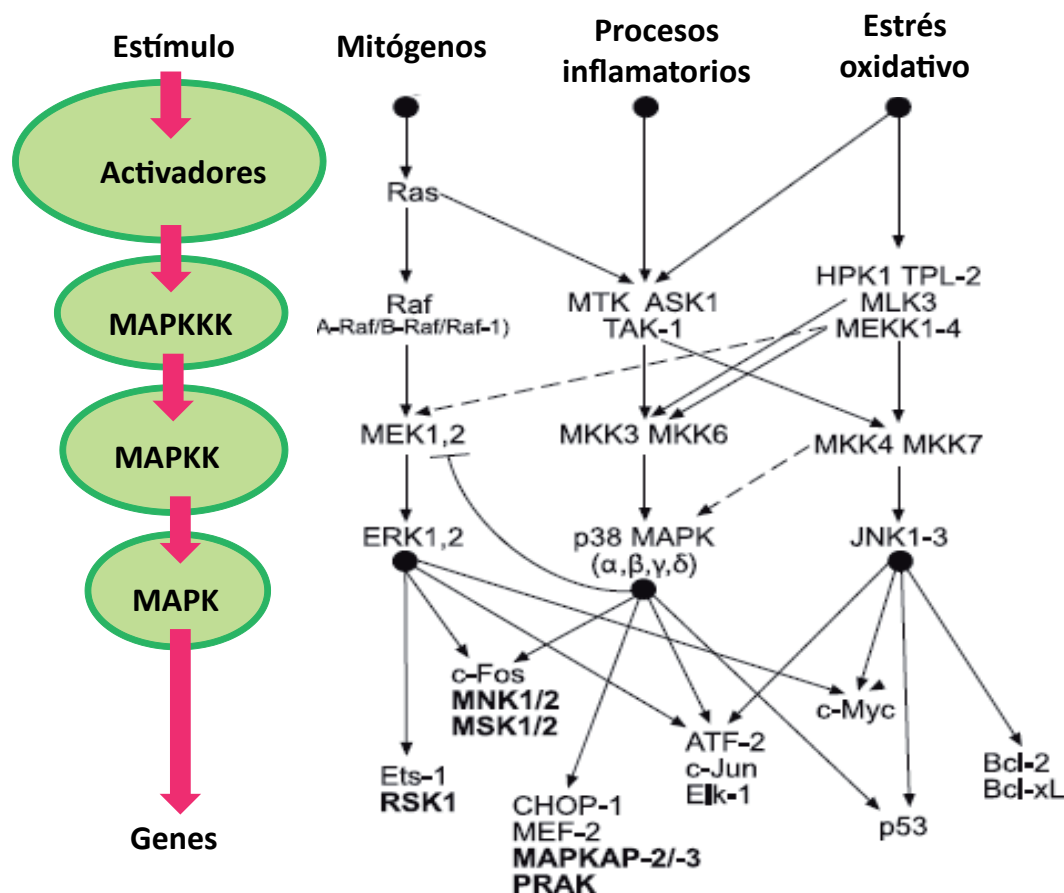
El grupo de proteínas JNK está formado por tres miembros JNK1, 2 y 3. Su vía de señalización es activada en respuesta al estrés celular y a las citoquinas, logrando mediar en funciones como proliferación celular, supervivencia o en apoptosis, dependiendo de las condiciones celulares y del tipo de estímulo. Además, cabe destacar que un cierto nivel de actividad JNK es necesario para la homeostasis celular, mientras que su activación por fuertes estímulos de estrés lleva a la apoptosis mediada por JNK en células primarias no transformadas. Esta ruta se inicia a partir de la activación de proteínas MAPKKKs, como ASK1, HPK1, MLK-3, MKKK1-4, TAK-1 y TPL-2, las cuales fosforilan a las MAPKKs denominadas MKK4 y MKK7, que son las que finalmente activan a las proteínas JNK. El clásico sustrato de las proteínas JNK es el factor de transcripción *c-Jun*, aunque también puede activar otros como *ATF-2*, *Elk-1*, *MEF-2c*, *p53* y *c-Myc*, así como sustratos no transcripcionales, entre los que se encuentran las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL (Figura 17) (Davis, 2000).

### **3.3. Proteínas p38-MAPK (MAP quinasas p38).**

Existen cuatro isoformas de la proteína p38-MAPK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), que pueden ser activadas en respuesta a un gran número de citoquinas inflamatorias, así como agentes patógenos y de estrés medioambiental, como estrés osmótico, luz ultravioleta, choque térmico e hipoxia. También se puede activar por algunos mitógenos, incluidos la eritropoyetina, factor de estimulante de colonias 1 (CSF-1) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Ashwell, 2006; Cuenda y Rousseau, 2007; Cuadrado y Nebreda, 2010).

Dentro de las MAPKKKs responsables de la activación de p38-MAPK,

destacan MTK1, MLK3, MEKK1-4, ASK1 y TAK-1, cuya actividad viene determinada por los distintos tipos de estímulos, como es el caso de MTK1, que sólo podría mediar en la señalización inducida por estrés y no por citoquinas. La activación de p38-MAPK se produce gracias a dos activadores fundamentales, MAPKKs, que van a ser del tipo MKK6 y MKK3, que a su vez son activadas por las MAPKKKs. Cabe resaltar que ambas MAPKKs no ofrecen las mismas funciones atribuidas a la p38-MAPK. Por ejemplo, se ha visto que en la apoptosis de células T se requiere la actividad de MKK3 pero no así la de MKK6 (Tanaka y cols., 2002). Distintos estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que aunque MKK4 activa preferentemente a la JNK, también es capaz de contribuir a la activación de p38-MAPK (Jiang y cols., 1997; Brancho y cols., 2003). Las proteínas p38-MAPK fosforiladas pueden activar factores de transcripción como *ATF-2*, *CHOP-1*, *MEF-2*, *p53* y *Elk1*. Además, también puede activar otras quinasas como MNK1 y MNK2, MSK1, PRAK, MAPKAPK-2 y MAPKAPK-3 (Figura 17).



**Figura 17. Vías de señalización de MAP quinasas.** Estas vías se organizan en cascadas modulares a partir de un estímulo concreto. Se muestran los componentes principales de las vías MAP quinasas y ejemplos de las proteínas diana. Las líneas punteadas indican las interconexiones entre las distintas vías de las quinasas en determinados contextos celulares. Imagen adaptada de (Junttila y cols., 2008).

## 4. PROTEÍNAS FOSFATASAS.

La inactivación de las rutas de las MAP quinasas es esencial para la fisiología celular en respuesta a estímulos extracelulares y para la prevención de los efectos nocivos que se producen tras una estimulación prolongada en el tiempo (Murphy y Blenis, 2006; Ramos, 2008). Por ello, es muy importante una modulación muy precisa tanto de la duración, como de la intensidad de la respuesta generada por las rutas de las MAP quinasas.

La desfosforilación de las proteínas MAP es posible gracias a la acción de los distintos tipos de proteínas fosfatasas que regulan las rutas de señalización de las MAP quinasas en todos los niveles mediante mecanismos de retroalimentación negativa.

Todas las MAP quinasas cuentan con un motivo treonina-X-tirosina (Thr-X-Tyr) en el subdominio VIII de la quinasa. Por este motivo, la fosforilación de los dos residuos de treonina y tirosina presentes en el dominio de activación de estas MAP quinasas es necesaria para que éstas se encuentren activas. Sin embargo, la desfosforilación de tan sólo uno de estos residuos es suficiente para conseguir la inhibición de su actividad catalítica (Marshall, 1995).

Entre las proteínas fosfatasas capaces de actuar sobre MAP quinasas se encuentran las fosfatasas de serina/treonina (PSPs) y las fosfatasas de tirosinas (PTPs). Formando parte de las PTPs, se encuentra un grupo muy importante de fosfatasas, denominadas de especificidad dual (DUSPs), que pueden actuar sobre residuos de serina/treonina y tirosina. Dentro del grupo de DUSPs se incluye un subgrupo de fosfatasas específicas para las MAP quinasas (MKPs). A continuación se explicará con más detalle los distintos tipos de proteínas fosfatasas haciendo especial hincapié en la fosfatasas de especificidad dual específicas para MAP quinasas ya que el trabajo de la presente Tesis, como se explicará más adelante en el apartado de *Resultados y Discusión*, se centra en los mecanismos de acción de este tipo de fosfatasas.

### **4.1. Proteínas serina/treonina fosfatasas (PSPs).**

Las serina/treonina fosfatasas (PSPs) se caracterizan por su capacidad para eliminar grupos fosfato de los residuos de Ser/Thr fosforilados de sus sustratos. La mayor parte de las PSPs se dividen en fosfatasas de tipo 1 (PP1) y fosfatasas de tipo 2 (PP2).

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) se encuentra involucrada en funciones



relacionadas con la regulación del metabolismo celular, replicación del ADN, procesamiento del ARN, traducción, progresión del ciclo celular, morfogénesis, desarrollo y transformación, así como en la regulación de una gran cantidad de quinasas (Saxena y Mustelin, 2000). Se trata de una proteína heterotrimérica compuesta por una subunidad que actúa como proteína de andamiaje (scaffold) y una subunidad catalítica (PP2Ac), que se asocia con una gran variedad de subunidades reguladoras que modulan su actividad, especificidad de sustrato y localización subcelular (Janssens y Goris, 2001; Janssens y cols., 2005)). Varios mecanismos, como los relativos a la composición de la holoenzima, la metilación y la fosforilación de la subunidad catalítica, pueden regular su actividad (Cho y cols., 2007). La actividad de PP2A es inhibida por una gran variedad de toxinas naturales, como el ácido okadaico (OA), por la caliculina A, así como por varias proteínas virales, como la del antígeno T del virus del simio 40 (SV40) y la proteína del adenovirus E4orf4. Numerosas observaciones sugieren un importante papel de la PP2A en la regulación negativa de la ruta de las MAP quinasas. Por ejemplo, se ha visto que la PP2A desfosforila MKK3, que es la responsable de la activación de la proteína p38-MAPK (Prickett y cols., 2007). Otros ejemplos de regulación cruzada entre distintos tipos de MAP quinasas describen que la PP2A pueden ser sustrato de la p38-MAPK, y cuando se activa, desfosforila e inactiva a la MEK1/2, conllevando de ese modo a la inactivación de las proteínas ERK1/2 (Westermarck y cols., 2001; Liu y cols., 2003; Li y cols., 2003; Junttila y cols., 2008). Además, se ha comprobado que los inhibidores de la PP2A, como el OA y el antígeno T de SV40, inducen un aumento en los niveles de fosforilación y activación de MEK1/2, y por tanto, una sobreactivación de las proteínas ERK1/2 (Sontag y cols., 1993; Westermarck y cols., 1998).

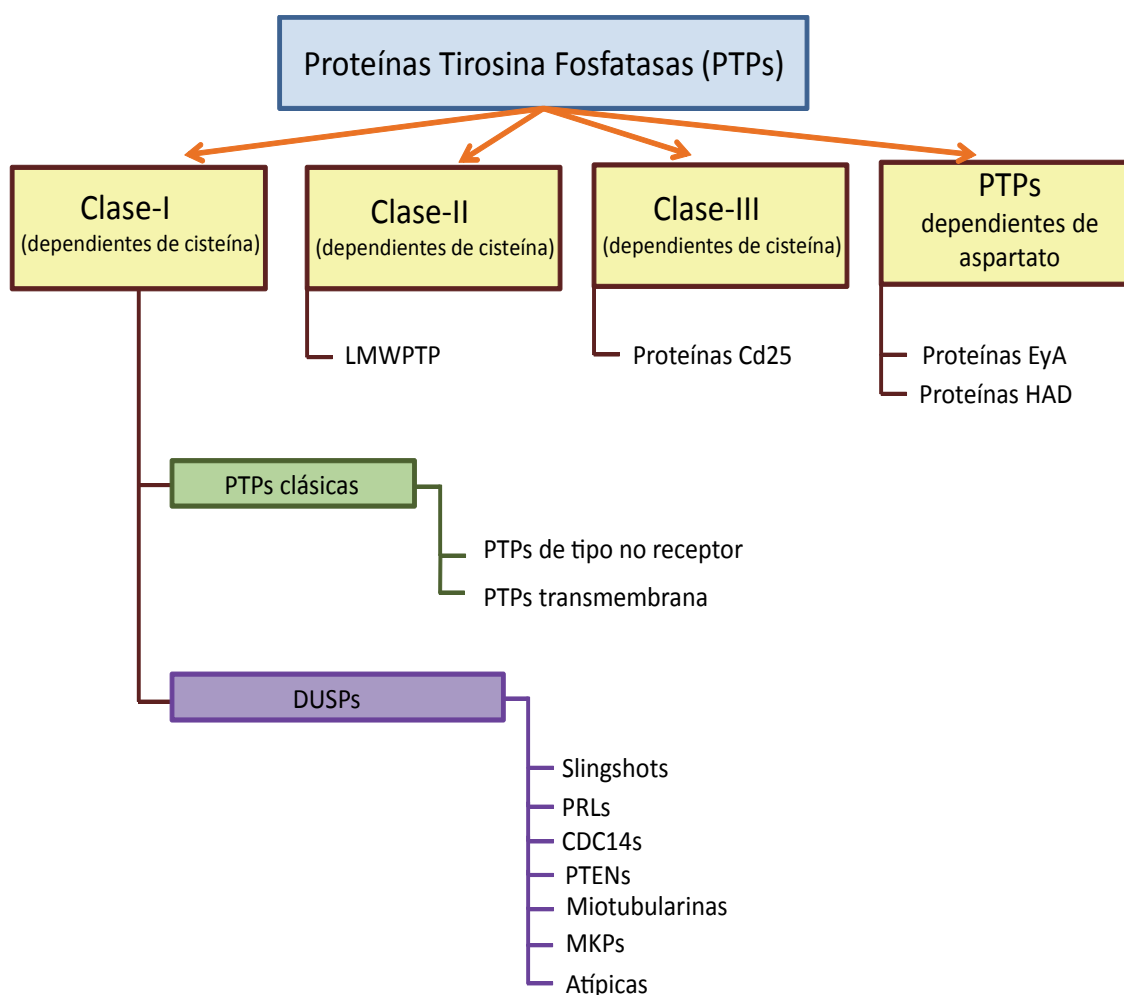
Finalmente, además de la proteína fosfatasa PP2A, existe otro tipo importante de PSPs, que es la denominada PP2C a la cual tradicionalmente se le ha vinculado con la regulación negativa de la vía de señalización de la proteína p38-MAPK (Hanada y cols., 2001).

## **4.2. Proteínas tirosina fosfatasas (PTPs).**

Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs) forman un gran grupo de enzimas altamente específicas que comprende un total de 107 genes en el genoma humano (Figura 18) (Alonso y cols., 2004). Se dividen en cuatro grupos clasificados en base a la secuencia de aminoácidos de los dominios catalíticos de las fosfatasas, siendo la Clase I el grupo más grande e importante. Las PTPs de Clase I basadas en cisteína, es una de las familias más grandes de PTPs, con 99 miembros que se

clasifican en subfamilias basándose en la arquitectura del dominio catalítico de la proteína (Alonso y cols., 2004). Este grupo de PTPs se caracteriza por presentar en su centro catalítico un residuo de cisteína responsable para el ataque nucleofílico que ejercerá sobre el sustrato. La sustitución del residuo de cisteína da lugar a la pérdida completa de la actividad enzimática de la fosfatasa.

La Clase I de PTPs se divide en dos grupos: PTPs clásicas, que desfosforilan específicamente en residuos de fosfotirosina, y fosfatasas de especificidad dual (DUSPs) que desfosforilan tanto a residuos de fosfotirosina como residuos de fosfotreonina/serina. Dentro del grupo de DUSPs, se encuentran las fosfatasas específicas de MAP quinasas (MKPs), a las que frecuentemente se las considera como grupo único. En la Figura 18 se muestra un esquema general de la clasificación de las PTPs.



**Figura 18. Clasificación de las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs).** Las PTPs se pueden clasificar en subgrupos en base a la similitud de secuencia y la presencia de dominios funcionales o vinculantes. Imagen adaptada de (Patterson y cols., 2009).



#### 4.2.1. PTPs clásicas.

Los miembros de esta familia de tirosina fosfatases se identifican por desfosforilar residuos de tirosina. Además del dominio catalítico, que posee un alto grado de conservación, poseen regiones que juegan un papel fundamental en la localización subcelular, en la regulación de la actividad enzimática o en el reclutamiento de ligandos específicos (Alonso y cols., 2004).

Existen numerosos ejemplos en la bibliografía que ponen de manifiesto la importancia de las PTPs clásicas en la regulación de las MAP quinasas. Benjamin Neel y su grupo de investigación comprobaron el papel de la PTP SH-2 (proteína fosfatasa con dominios SH2) en la activación de ERK1/2 a través de receptores de tirosina quinasas (RKT) a través de quinasas Src (quinasas del retrovirus del sarcoma de Rous) (Zhang y cols., 2004). Por otro lado, se demostró que las tirosina fosfatases hematopoyéticas (HePTP) mantenían a las proteínas ERK1/2 en estado desfosforilado. Además, la fosforilación de HePTP por parte de la proteína quinasa A provoca un aumento de la actividad de ERK1/2 (Saxena y cols., 1999). En un modelo de células neuronales, se ha comprobado que un homólogo de HePTP, la fosfatasa STEP (proteína fosfatasa enriquecida del estriado), regula la duración de la actividad de ERK1/2 en respuesta a la estimulación del receptor de NMDA (Paul y cols., 2003). También ha sido propuesta la PTP épsilon ( $\epsilon$ ) como un inhibidor fisiológico de la señalización de ERK1/2 para la inducción de la protección celular tras su activación prolongada en el tiempo (Toledano-Katchalski y cols., 2003).

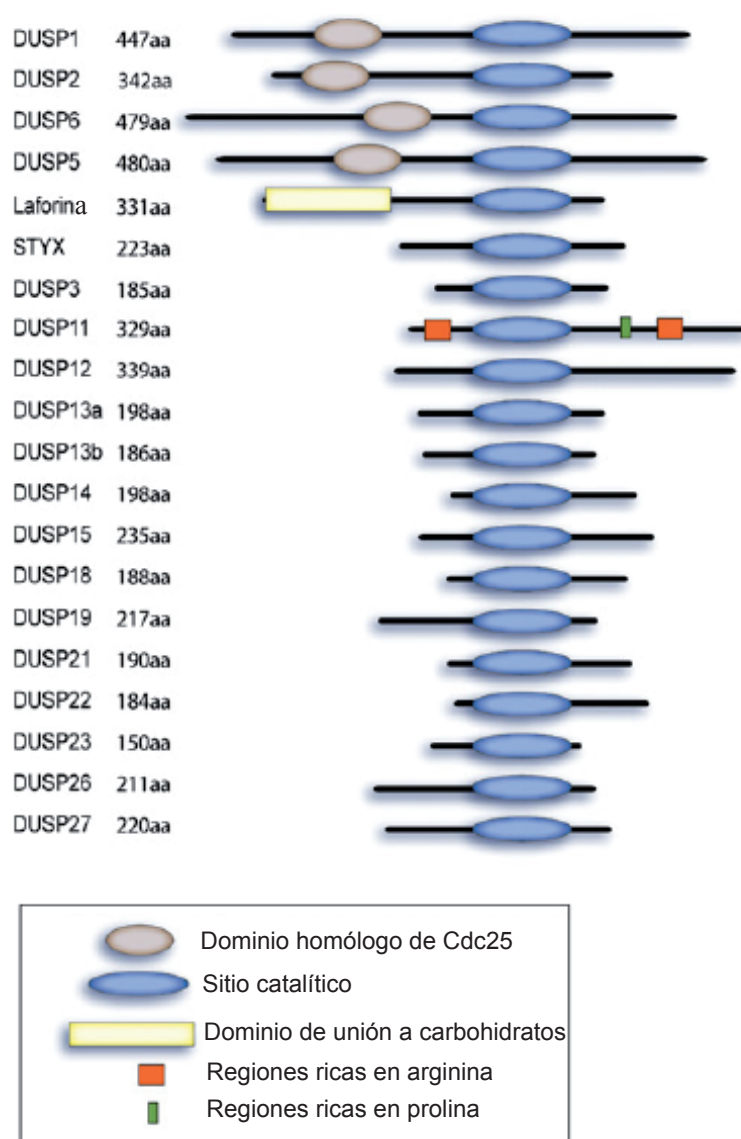
#### 4.2.2. Fosfatases de especificidad dual (DUSPs).

Las fosfatases de especificidad dual (DUSPs) se caracterizan por desfosforilar tanto residuos de fosfotreonina como de fosfotirosina. Esta habilidad puede ser atribuida a la flexibilidad y la profundidad de la hendidura de la superficie enzimática, la cual facilita el acomodamiento de ambos tipos de residuos fosforilados y mejora en gran medida la actividad catalítica de las DUSPs (Owens y Keyse, 2007).

Las primeras que se identificaron fueron un grupo de 25 fosfatases de especificidad dual identificadas desde DUSP1 a DUSP28, siendo DUSP17, -20 y -23 asignadas como DUSP19, -18 y -25 respectivamente. Dentro de este grupo de 25 DUSPs, MS-STYX/DUSP24 y DUSP27 no cuentan con la cisteína catalítica para el ataque nucleofílico, ya que ha sido sustituida por una serina, careciendo por lo tanto de actividad fosfatasa. Estructuralmente todas las DUSPs tienen en común

una región C-terminal conservada con residuos de ácido aspártico, de cisteína y de arginina formando así un centro catalítico.

Estas 25 DUSPs pueden clasificarse basándose en su secuencia de aminoácidos, dentro de la cual unas cuentan con la intervención de un grupo de aminoácidos cargados positivamente denominado dominio de interacción de quinasas (KIM), también conocido como dominio de unión a MAPK (MKB). Las fosfatasas DUSPs que contienen el dominio KIM o MKB se denominan típicas o fosfatasas de MAP quinasas (MKPs), y las que carecen de dicho dominio, son designadas como fosfatasas DUSPs atípicas (Figura 19) (Huang y Tan, 2012).



**Figura 19. Representación esquemática de las DUSPs atípicas.** Las DUSPs atípicas son generalmente más pequeñas y carecen del dominio KIM común para DUSPs típicas. Imagen adaptada de (Patterson y cols., 2009).

Sin embargo, existen algunas excepciones en la nomenclatura de las MKPs, como por ejemplo MKP6/DUSP14 y MKP8/DUSP6 que son consideradas como fosfatasa atípicas ya que no presentan el dominio KIM, y las que sí que cuentan con éste como PAC1/DUSP2 y HVH3/DUSP5 y no reciben la calificación de MKPs (Huang y Tan, 2012).

Dentro de las fosfatasa de especificidad dual atípicas cabe destacar la fosfatasa laforina, codificada por el gen *EMP2A*, implicado en el control del metabolismo del glicógeno. La mutación de este gen promueve el desarrollo de la enfermedad de Lafora, un tipo epilepsia progresiva mioclonal caracterizada por formar inclusiones de glicógeno en el soma neuronal, en dendritas y en las neuronas corticales denominados cuerpos de Lafora (Ganesh y cols., 2006; Delgado-Escueta, 2007).

Además de las MKPs y DUSP atípicas, formando parte de las fosfatasa de especificidad dual, las PTEN (fosfatasa homóloga a la tensina) desfosforilan fosfolípidos de inositol (Alonso y cols., 2004). Estas fosfatasa se caracterizan por actuar como supresores tumorales ya que frecuentemente se encuentran silenciados, mutados o eliminados en distintos tipos de cáncer humanos provocando el aumento de la capacidad proliferativa celular y por tanto el desarrollo de la enfermedad (Wang y Jiang, 2008; Keniry y Parsons, 2008; Yin y Shen, 2008).

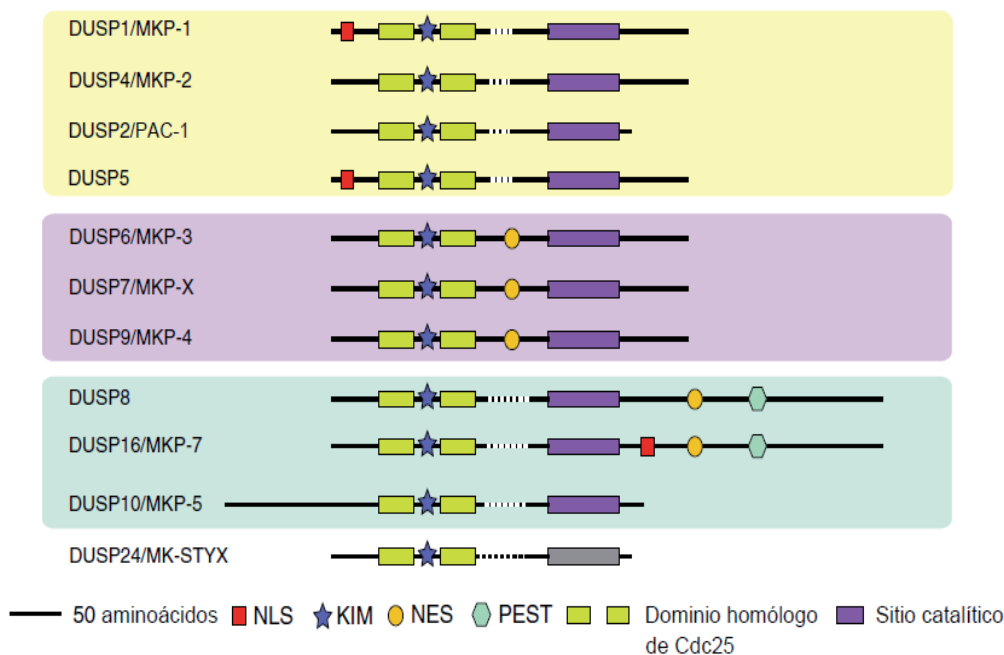
#### **4.2.2.1. Fosfatasa específicas de MAP quinasas (MPKs).**

Las MKPs es uno de los subgrupos mejor caracterizados de DUSPs. Estas fosfatasa cuentan con 10 proteínas que pueden desfosforilar a las MAP quinasas en residuos de fosfotreonina de fosfotirosina de forma simultánea dentro del motivo de activación Treonina-X-Tirosina (Thr-Xaa-Tyr) de las MAP quinasas y actuando de ese modo como reguladores negativos de las cascadas de señalización asociadas a estas quinasas.

Las MKPs, como se ha explicado anteriormente, poseen un dominio de interacción de quinasas (KIM) que confiere especificidad de sustrato a las MAP quinasas. Como se muestra en la Figura 20, este dominio se encuentra en la región N-terminal e interactúa con el dominio común (CD) de las MAP quinasas mediando la interacción enzima-sustrato y regulando la especificidad enzimática (Dickinson y Keyse, 2006). Además del dominio KIM, en el extremo N-terminal, todas las MKPs cuentan con dos regiones de secuencia homóloga al dominio catalítico de la fosfatasa Cdc25 (también denominado dominio CH2). En cuanto al extremo C-terminal, estas fosfatasa presentan una secuencia similar a la de la

fosfatasa VH-1 del *Vaccinia virus* (Keyse y cols., 1993; Denu y cols., 1996).

Además, algunas MKPs presentan una secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina (dominio PEST) en el C-terminal. Su presencia acelera la degradación de la fosfatasa, ya que se ha visto que cuando la proteína carece de ella se produce una estabilización de su efecto. También existen otros dominios adicionales en los extremos N- o C-terminales, aunque las funciones de éstos todavía no están bien caracterizadas (Figura 20) (Farooq y Zhou, 2004).



**Figura 20. Estructura de las MKPs.** En la imagen se muestra la estructura de los dominios de las diez MKPs catalíticamente activas y MK-STYX que es inactiva. Se indica el dominio N-terminal no catalítico que contiene homología con Cdc25, el sitio catalítico, el dominio de interacción con las quinasas (KIM), señales de exportación nuclear (NES), señales de localización nuclear (NLS) y las secuencias PEST. Imagen adaptada de (Dickinson y Keyse, 2006).

Estas fosfatasas contienen poca similitud con respecto a la secuencia primaria de las PTPs clásicas. Sin embargo, al igual que otras DUSPs, comparten un plegamiento estructural similar en el sitio catalítico (Denu y cols., 1996) y la mutación del residuo de cisteína dentro del sitio catalítico suprime su actividad fosfatasa (Denu y cols., 1996; Farooq y Zhou, 2004; Arantes, 2006). Las MKPs presentan diferentes especificidades de sustrato por una o más MAP quinasas, localizaciones celulares y modos de regulación. La desregulación de las MAP quinasas ha sido implicada en varias enfermedades y es objetivo de una extensa investigación (Pearson y cols., 2001; Chang y Karin, 2001; Johnson y Lapadat, 2002; Dickinson y Keyse, 2006).

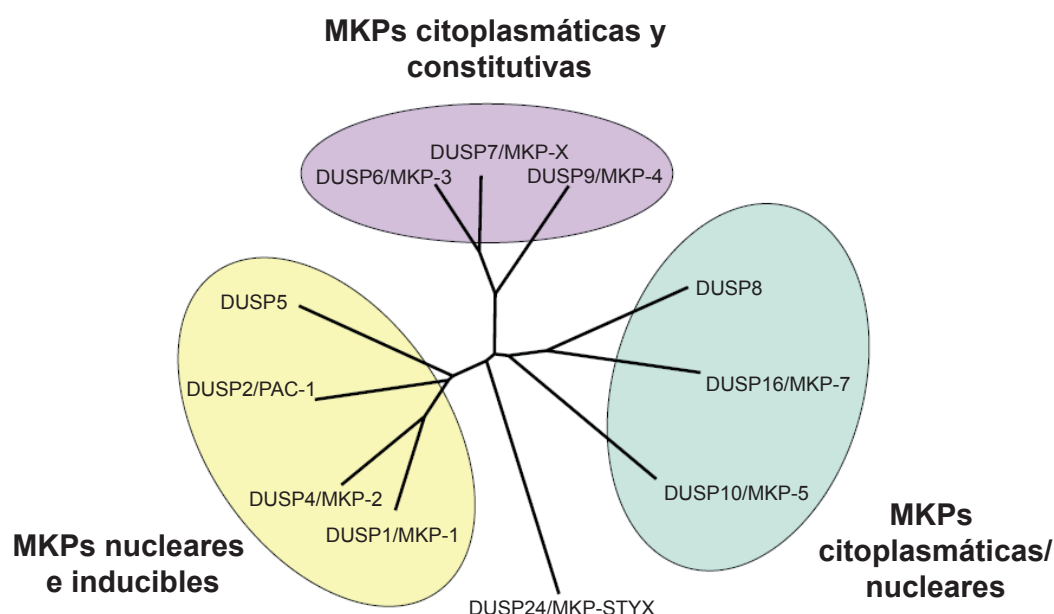
**Tabla 5. Nomenclatura y clasificación de MKPs.** Las MKPs se enumeran en esta tabla de acuerdo con la Organización del Genoma Humano (HUGO). LPS, lipopolisacárido; ND, no determinado. Datos obtenidos de (Kondoh y Nishida, 2007; Keyse, 2008; Patterson y cols., 2009).

Nombre	Peso Molecular (kDa)	Localización cromosómica	Nombres alternativos	Substrato específico	Localización Subcelular	Estímulos que activan MKPs inducibles
DUSP1	39.30	5q34	MKP-1, CL100, hVH1, 3CH134, PTPN10erp	p38=JNK>ERK	Nuclear	LPS, hipoxia, dexametasona, choque térmico, estrés oxidativo
DUSP2	34.40	2q11	PAC-1	ERK=p38>JNK	Nuclear	Factores de crecimiento, choque térmico, LPS
DUSP4	42.95	8p11-12	MKP-2, hVHR2, TYP1	ERK=JNK>p38	Nuclear	Mitógenos, factores de crecimiento
DUSP5	42.05	10q25	hVHR3, B23	ERK	Nuclear	IL-2, factores de crecimiento, choque térmico
DUSP6	43.32	12q22-23	MKP-3, Pyst1, rVHR6	ERK>JNK=p38	Citosólica	No
DUSP7	40.55	3p21	MKP-X, Pyst2, B59	ERK>JNK=p38	Citosólica	No
DUSP8	65.84	11p15.5	hVHR5, M3/6, HB5	JNK=p38>ERK	Nuclear y citosólica	No
DUSP9	41.87	Xq28	MKP-4, Pyst3	ERK>p38>JNK	Nuclear y citosólica	No
DUSP10	52.64	1q41	MKP-5	p38=JNK>ERK	Nuclear y citosólica	LPS, peptidoglicanos
DUSP16	73.10	12q13	MKP-7	JNK=p38>ERK	Citosólica	No
MK-STYX	35.82	7q11.23	STYX-L1	ND	ND	ND

#### 4.2.2.1.a) Clasificación de MKPs.

Los distintos tipos de MKPs se diferencian según la especificidad que muestran hacia los miembros de la familia de las MAP quinasas, su distribución tisular, su localización subcelular y su patrón de expresión (inducible o constitutivo) por estímulos extracelulares. En la Tabla 5 se resumen las características fundamentales de cada una de ellas (Kondoh y Nishida, 2007).

Estos criterios permiten que existan distintas formas de clasificarlas, y es por ello que no existe una clasificación única de estas fosfatasas de especificidad dual. Así, en función de la secuencia génica, la estructura proteica, la especificidad de sustrato y la localización subcelular, la familia de las MKPs puede dividirse en tres subgrupos (Figura 21) (Kondoh y Nishida, 2007).



**Figura 21. Clasificación de las MKPs.** Las secuencias de los aminoácidos de MKPs humanos fueron alineados utilizando el programa CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) creando un árbol filogenético. Los tres subgrupos de MKPs junto con las propiedades que las definen se indican en óvalos de colores. Imagen adaptada de Dickinson y Keyse (2006).

**MKPs nucleares e inducibles:** DUSP1/MKP-1, DUSP2/PAC-1, DUSP4/MKP-2 y DUSP5. Los genes que codifican estas fosfatasas poseen cuatro exones e intrones con posiciones altamente conservadas, lo que sugiere que provienen de un gen ancestral común. Estas fosfatasas desfosforilan a ERK, JNK y p38-MAPK en la misma medida. Curiosamente, DUSP1 puede ser la fosfatasa responsable de la desfosforilación de la histona H3 inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Kinney y cols., 2009).

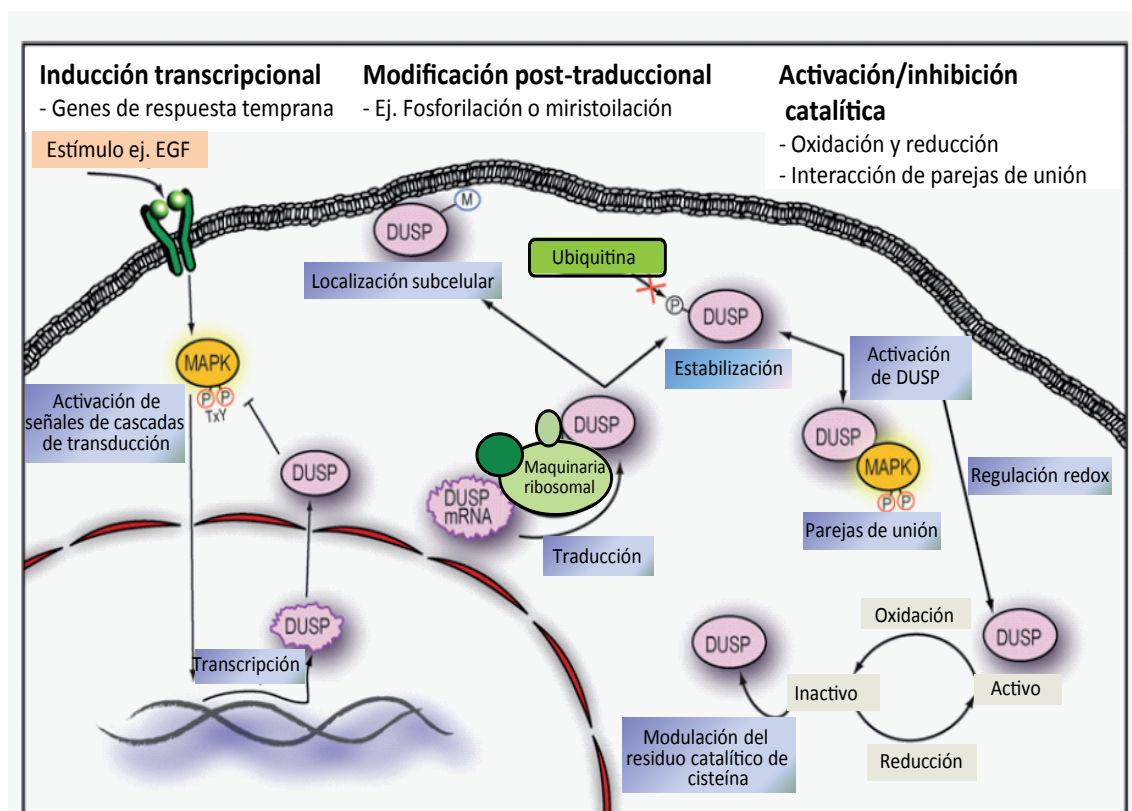


**MKPs citoplasmáticas y constitutivas:** DUSP6/MKP-3, DUSP7/MKP-X y DUSP9/MKP-4. Los genes de estas fosfatasa poseen cuatro exones. Este grupo de MKPs desfosforila preferentemente las proteínas ERK. Se ha propuesto que DUSP6 además de inactivar a ERK1/2 en el citosol, puede participar en el transporte de ERK1/2 desfosforilada desde el núcleo al citosol (Brunet y cols., 1999; Karlsson y cols., 2004).

**MKPs citoplasmáticas/nucleares:** DUSP8, DUSP10/MKP-5 y DUSP16/MKP-7. Los genes que codifican estas fosfatasa tienen seis exones, y desfosforilan selectivamente JNK y p38-MAPK, que son las MAP quinasas activadas por estrés (Bermúdez y cols., 2010).

#### 4.2.2.1.b) Regulación de las MKPs.

Así como las MAP quinasas son reguladas por las MKPs, éstas a su vez también son reguladas en múltiples niveles (Figura 22), siendo una importante característica de las proteínas que desempeñan un papel en la puesta a punto de las principales cascadas de señalización.



**Figura 22. Regulación de MKPs.** Esquema representativo de regulación de las MKPs a nivel transcripcional, post-traduccional y de activación o inhibición catalítica tras la inducción de un estímulo apropiado, como por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Imagen adaptada de (Patterson y cols. 2009).



Muchas MKPs son inducibles y muestran una baja expresión en reposo o en células que no han sido afectadas por ningún estímulo de estrés. En cambio, si se produce una estimulación, por ejemplo, por parte de factores de crecimiento, citoquinas o suero, la expresión de estas MKPs de tipo inducible aumenta muy rápidamente. Esta inducción es a menudo dependiente de la activación de las MAP quinasas que son sus propios sustratos, y por lo tanto, se piensa que se trata de un mecanismo de feedback negativo debido a una regulación negativa de la señalización mitogénica.

La transcripción de las MKPs puede ser activada por factores que se encuentran por la parte baja de la cascada de señalización de MAP quinasas (Brondello y cols., 1997), como por ejemplo AP-1 (proteína activadora 1). Sin embargo, la expresión de las MKPs también es regulada por otros factores de transcripción. Por ejemplo, en la caracterización del promotor de MKP1/DUSP1 se encontraron sitios de unión para Sp1, Sp3, CREB y USF1 (Ryser y cols., 2004). MKP3/DUSP6, en cambio, puede ser inducida por ETS-1, que se activa tras la estimulación del factor de crecimiento de fibroblastos, FGF REF (Ekerot, 2008, *Biochem J*, 412:287).

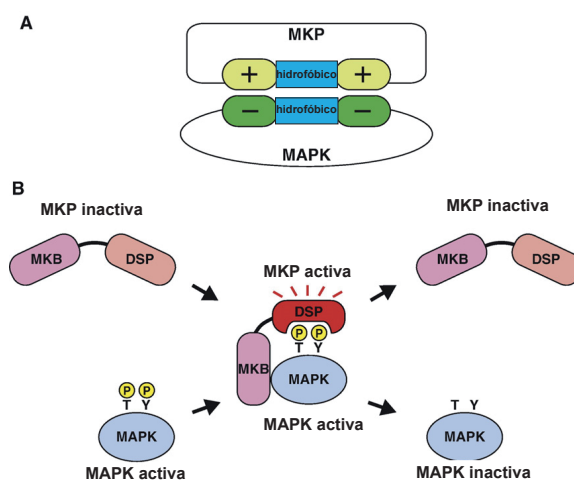
Además de estos factores, la activación transcripcional de MKPs también es regulada por modificaciones epigenéticas a través de metilaciones o modificaciones de la cromatina (Li y cols., 2001; Waha y cols., 2010). Por ejemplo, la pérdida de la expresión de DUSP6 en cáncer de páncreas se debe a la hipermetilación de su promotor (Xu y cols., 2005). Recientemente, se ha demostrado que las histonas asociadas al gen de DUSP1 son acetiladas como consecuencia de la activación de receptores de tipo Toll (receptores Toll-like, TLR) (Chi y Flavell, 2008). La activación de la expresión génica de DUSP1 en respuesta a la activación de TLR provoca un mecanismo de retroalimentación negativa de tal manera que atenúa la actividad de p38-MAPK disminuyendo así la respuesta inmune innata.

A diferencia de las MKPs inducibles, otras DUSPs típicas como MKP3/DUSP6, son expresadas constitutivamente (Tanzola y Kersh, 2006), de modo que pueden servir para mantener a las proteínas MAP quinasas por debajo del umbral de activación, para que los efectos de la fosforilación y activación con la llegada de un nuevo estímulo sean más efectivos. Esta función ha sido propuesta para VHR/DUSP3, la cual podría estar coordinada con una serina/treonina fosfatasa PP2A (Todd y cols., 1999).

Las MKPs pueden también estar sujetas a modificaciones post-traduccionales. Debido a la presencia de un residuo de cisteína en el dominio

catalítico, la actividad de las MKPs es sensible a la oxidación reversible e inactivación. La oxidación reversible de la cisteína conservada del dominio catalítico de las MKPs suprime sus propiedades nucleofílicas y conduce a un cambio de conformación de la hendidura catalítica dando lugar a la inactivación de la fosfatasa. Este proceso puede ser provocado por la formación de especies reactivas de oxígeno en el interior celular durante situaciones que inducen estrés oxidativo, como la exposición al agua oxigenada ( $H_2O_2$ ). Este mecanismo sería el responsable de la inactivación mantenida de la actividad de la fosfatasas MKPs que se observa tras la exposición a estímulos citotóxicos o condiciones patológicas que cursan con estrés oxidativo (Chiarugi y Cirri, 2003; Lambeth, 2004; Tonks, 2005).

La actividad catalítica de algunas MKPs puede ser potenciada tras la unión con sus sustratos, las MAP quinasas (Figura 23) (Camps y cols., 1998; Zhou y cols., 2006). La determinación de la estructura cristalina de ciertas MKPs ha llevado a la comprensión de que este mecanismo pueda ser provocado por un cambio conformacional del sitio catalítico que implica un residuo de ácido aspártico (Stewart y cols., 1999).



**Figura 23. Interacción de las MKPs con las MAP quinasas.** **A)** Acoplamiento entre MKPs y MAP quinasas. La superficie de acoplamiento del dominio de unión a MAP quinasas (MKB) puede dividirse en tres módulos, uniéndose a los sitios correspondientes de MAP quinasas. **B)** Activación de MKPs por MAP quinasas. La unión de las MAP quinasas al dominio MKB induce cambios conformacionales provocando un aumento de la actividad catalítica de las MKPs. Imagen adaptada de (Kondoh y Nishida, 2007).

Además, estas fosfatasas pueden ser fosforiladas directamente por su sustrato o sustratos específicos de MAP quinasas, conduciendo de ese modo al aumento de la estabilización y de la vida media de estas fosfatasas, siendo en condiciones normales de una hora aproximadamente. Este mecanismo se ha descrito para DUSP1, y en este caso, la fosforilación reduce su ubiquitinación y

degradación por la vía del proteasoma (Takeshita y cols., 1989, Brondello y cols., 1999).

#### 4.2.2.1.c) MKPs y patologías.

Como hemos indicado anteriormente, las fosfatasas de especificidad dual, tienen un papel muy importante en la regulación de las MAP quinasas, por lo tanto, cuando se produce la desregulación de estas fosfatasas puede conducir a diversos trastornos de considerable importancia como por ejemplo, enfermedades de tipo inflamatorio, neuronales, desarrollo de tumores, hipoxia e incluso provocar resistencia a la quimioterapia. A continuación se exponen varios ejemplos de cómo pueden afectar estas fosfatasas en el desarrollo de estas alteraciones y como pueden ser consideradas como posibles dianas terapéuticas.

- Regulación de la respuesta inmune.

Han sido varios los estudios en los que se han relacionado cambios en la respuesta inmune innata y adaptativa con mutaciones de proteínas fosfatasas, principalmente DUSP1, DUSP2 y DUSP10. Por ejemplo, en ratones deficientes del gen *dusp1* se incrementa la incidencia y la gravedad de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide y también se ha visto aumentada la sensibilidad al shock endotóxico letal (Chi y cols., 2006; Hammer y cols., 2006; Salojin y cols., 2006). Además, en los macrófagos de estos animales se encuentran elevados los niveles de citoquinas. Por ello, DUSP1 ha sido propuesto como un importante regulador negativo en la función de los macrófagos y de la respuesta inflamatoria, jugando de ese modo un papel regulador en la respuesta innata y adaptativa a través de la inactivación de p38-MAPK (Hammer y cols., 2005; Chi y cols., 2006).

Otro caso parecido se describió para los ratones deficientes para el gen *dusp10*, para los cuales, los macrófagos también producen altas concentraciones de citoquinas pro-inflamatorias. Además, estos ratones presentan una mayor resistencia a la inducción del modelo de encefalitis autoinmune experimental (EAE), lo que sugiere que esta fosfatasa juega un papel crucial en la generación y expansión de las células T autorreactivas en esta enfermedad. En cambio, en los ratones deficientes en *Dusp10*, se observaron menos diferencias a nivel de la respuesta primaria frente a la infección del virus de la corimeningitis linfocitaria (LCMV) en comparación con los ratones que no carecen de *dusp10*. Sin embargo, una segunda exposición al LCMV provocaba efectos letales entre los ratones deficientes de *dusp10*, probablemente por los altos niveles séricos del factor

de necrosis tumoral (TNF) tras la exposición al virus. Por lo tanto, DUSP10 se define también como un regulador negativo de la respuesta inmune innata y un regulador de la funcionalidad de las células T, actuando a principalmente través de un mecanismo dependiente de la inactivación de JNK (Zhang y cols., 2004).

Si en los casos de ausencia de los genes *dusp1* y *dusp10* se potenciaba la respuesta inflamatoria causadas por una producción aumentada el aumento de citoquinas pro-inflamatorias, en los ratones deficientes para el gen *dusp2* se observó el efecto contrario en un modelo de artritis reumatoide, es decir, que los macrófagos producían menores niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de quimioquinas en comparación con los ratones control. Aunque se ha descrito que DUSP2 regula negativamente a p38-MAPK y a ERK1/2 *in vitro* (Chu y cols., 1996), estudios *in vivo* para ratones deficientes de *dusp2*, han demostrado que esta fosfatasa también podría actuar como un regulador negativo de la actividad de JNK, así como un regulador positivo de la respuesta inmune a través de una interacción entre JNK y ERK1/2 (Jeffrey y cols., 2006).

- Cáncer.

Como se ha indicado anteriormente, las proteínas MAP quinasas se encuentran implicadas en proliferación, supervivencia y migración, funciones que se ven a menudo desreguladas en cáncer. Las anomalías oncogénicas se encuentran frecuentemente en los componentes de la parte superior de la señalización de ERK1/2, JNK y p38 MAPK, que incluso pueden llegar a tener un papel importante como supresores tumorales en diversas condiciones (Keyse, 2008). Además, las proteínas MAP quinasas pueden también estar implicadas en la respuesta de las células tumorales en los tratamientos contra el cáncer, por lo tanto, las MKPs pueden tener un papel determinante en la inducción y en la progresión de esta enfermedad. Las variaciones de la expresión de estas fosfatasas sugieren que pueden actuar como reguladoras tumorales según el tipo de cáncer y el estado de la progresión. Este tipo de variaciones pueden tener diversas causas, siendo una de ellas la pérdida de heterocigosidad como se ha visto para DUSP4, DUSP6, DUSP7, DUSP10 y DUSP16 (Patterson y cols., 2009).

Muchos de los tumores humanos expresan altos niveles de DUSP1, aunque su aumento depende de la etapa en la que se encuentre el tumor. Por ejemplo, en tumores epiteliales como el de próstata, colon y vejiga, DUSP1 se sobreexpresa en las primeras etapas del cáncer y va disminuyendo a medida que la enfermedad va progresando. Existen estudios de ARN de interferencia (siARN) en los que se demuestra que DUSP1 podría ser considerada como una diana interesante para

mejorar el tratamiento contra el cáncer, sin embargo, hay que tener en cuenta que para algunos tipos de cáncer, como el carcinoma hepatocelular, DUSP1 presenta el efecto contrario, ya que su expresión en este caso disminuye (Tsujita y cols., 2005).

Entre las fosfatasa nucleares inducibles, DUSP4 también se sobreexpresa en estadios tempranos de tumores de ovario, en células pancreáticas cancerígenas con mutaciones K-ras, en hepatomas y en cáncer de mama (Keyse, 2008). Sin embargo, los niveles de esta fosfatasa disminuyen en tumores de pulmón que albergan mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Chitale y cols., 2009).

El papel de DUSP2 también depende del contexto celular en el que se encuentre. Como ejemplo, la pérdida de su expresión en leucemias agudas se correlaciona con los altos niveles de ERK1/2 activada (Kim y cols., 1999), mientras que su elevada expresión ha sido asociada con peores diagnósticos para la supervivencia en los carcinomas de ovario (Givant-Horwitz y cols., 2004).

En cuanto a las fosfatasa citoplasmáticas, encontramos a DUSP7 sobreexpresada en leucemia aguda (Levy-Nissenbaum y cols., 2003), especialmente en leucocitos de pacientes de leucemia mieloide (AML). En cuanto a DUSP9, se ha propuesto como supresor tumoral, ya que se ha observado una disminución en la formación de tumores en ratones que sobreexpresan esta fosfatasa (Liu y cols., 2007).

Son muchos los estudios que han implicado a DUSP6 en la progresión y resistencia de los tratamientos al cáncer. El tumor de páncreas está frecuentemente asociado con la pérdida de heterocigosidad en varias regiones cromosómicas entre las que se incluyen 12q21-123.1 entre otras. El gen de *dusp6* se localiza en esta región y a menudo se expresa de forma disminuida en tejidos de cáncer de páncreas y en otras líneas celulares como resultado de la hipermetilación de su promotor (Xu y cols., 2005). La reintroducción de *dusp6* en estas células a través de una infección adenoviral da lugar a una regulación negativa de la señalización de las ERK1/2, a la supresión del crecimiento de las células tumorales y al aumento de la apoptosis. Más recientemente, se ha visto que en cáncer de pulmón también está asociado con la regulación decreciente de la expresión de DUSP6, y que la restauración de su expresión da lugar a la supresión del crecimiento tumoral (Okudela y cols., 2009).

Por otro lado, esta fosfatasa parece estar sobreexpresada en otros tipos de cáncer en los que se producen mutaciones en las vías Ras-MAPK. B-Raf está

frecuentemente mutada en melanomas pero también en tumores melanocíticos benignos. Los mutantes V600E cuentan con más del 90% de las mutaciones en B-Raf produciendo una sobreactivación de MEK y ERK1/2 en los melanocitos. Otros melanomas presentan mutaciones Q61R en N-Ras principalmente en sitios que han sido expuestos al sol. Los niveles de DUSP6 están aumentados en las líneas celulares de ambos tipos de melanoma (Bloethner y cols., 2005). Por lo tanto, esta sobreactivación que se produce en la vía MEK/ERK1/2 da como resultado la activación de la transcripción del gen *dusp6*.

Estos datos obtenidos con diferentes tipos de tumores indican que las mutaciones que conducen a la activación de la vía MEK/ERK no necesariamente predice un destino específico para los niveles de expresión de DUSP6. También cabe destacar que las mutaciones que activan la vía Ras/Raf/MEK/ERK1/2 no siempre conducen a la sobreactivación de ERK1/2, por lo que los niveles de actividad de esta proteína no se puede relacionar de manera indiscutible con la agresividad del cáncer (Hoshino y cols., 1999).

- Resistencia a la quimioterapia.

Estudios recientes demuestran que DUSP6 también puede estar implicada en la resistencia de los tumores frente al tratamiento con fármacos. En tumores de ovario primarios de humanos se han detectado bajos niveles de expresión de DUSP6 tanto en proteína como en ARN mensajero, asociados con la elevada actividad de las proteínas ERK1/2 (Caunt y cols., 2008). Además, una disminución de los niveles de expresión de DUSP6 cuando se silencia el gen con el siARN produce un incremento en la resistencia de estas células al cisplatino, un agente intercalante del ADN que se emplea en quimioterapia y que induce la apoptosis en células tumorales. Por el contrario, la sobreexpresión de DUSP6 reduce la actividad de ERK1/2 y tiene un efecto sensibilizante a la muerte celular inducida por cisplatino tanto *in vivo* como *in vitro* (Chan y cols., 2008).

- Hipoxia y patologías neuronales.

En condiciones fisiopatológicas, como ocurre durante el desarrollo y también en el cáncer, las células pueden estar sometidas a cambios en los niveles de oxígeno, que pueden generar tanto condiciones de hiperoxia como de hipoxia, lo que da lugar a distintos tipos de adaptaciones a nivel del metabolismo celular y de la expresión génica. En condiciones de hipoxia, el factor de transcripción HIF (factor inducible de hipoxia) controla la expresión de más de 100 genes, incluyendo los que codifican para factores de crecimiento angiogénico, como el VEGF, genes



que se inducen por hipoxia, como la anhidrasa carbónica IX o Bnip3 (un miembro de la familia de proteínas proapoptóticas BH3). En células endoteliales en cultivo sometidas a hipoxia, se descubrió que DUSP6 se sobreexpresaba de manera similar a VEGF (Manalo y cols., 2005). Además, la expresión de DUSP6 fue 9,2 veces mayor en esferoides tumorales del melanoma NA8 en comparación con las células control (Ghosh y cols., 2005), probablemente provocado por la formación de un gradiente hipóxico en el interior de los esferoides, el cual también provoca la inducción de genes propios de la hipoxia tales como la anhidrasa carbónica IX.

También se ha comprobado que el aumento que se produce en el ARN mensajero de *dusp6* inducido por hipoxia estaría mediado por un aumento en la actividad de ERK1/2. Este proceso podría explicarse por la inhibición de la actividad enzimática de DUSP6, debida a la modificación en el residuo crítico del cisteína del dominio catalítico de la fosfatasa que sería provocado por la actuación del óxido nítrico (NO) (Kamata y cols., 2005).

Es interesante destacar que la actividad de DUSP6 disminuye también en macrófagos pulmonares expuestos a condiciones de hiperoxia, en respuesta a un incremento de la expresión de ERK1/2 que se produce como mecanismo reparador para inducir supervivencia celular (Rossig y cols., 2000).

Más allá de lo observado en células tumorales o del sistema inmune, se han detectado, asimismo, cambios en la expresión de DUSP6 en células neurales. Mientras que la expresión de esta fosfatasa disminuye en la polineuropatía amiloidótica familiar (Monteiro y cols., 2006), su actividad se ve aumentada en focos epilépticos corticales en humanos (Rakhade y cols., 2005). La desregulación de esta fosfatasa también está implicada en otras patologías neuronales importantes que cursan con neurodegeneración, como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, ya que la oxidación de DUSP6 producida por especies reactivas de oxígeno (ROS) y la inhibición de su actividad catalítica pueden ser una consecuencia más de los efectos del estrés oxidativo que llevan asociadas estas enfermedades (Levinthal y Defranco, 2005).

Todas estas evidencias indican que las fosfatasas DUSPs o MKPs constituyen una importantísima diana terapéutica en la regresión y erradicación de las células tumorales, como así también en otras muchas patologías del ser humano.





## *Objetivos*





## OBJETIVOS.

De acuerdo con los trabajos anteriores del grupo, los nucleótidos actúan como señales extracelulares relevantes en la fisiología celular de las neuronas granulares de cerebelo, actuando como factores tróficos alternativos cuando está comprometida la integridad celular. Los receptores nucleotídicos P2Y<sub>13</sub> y P2X7 están acoplados a la inhibición de la proteína GSK3, cuya actividad debe mantenerse regulada de manera estricta para asegurar la supervivencia celular. Este mecanismo de acción era responsable de la neuroprotección ejercida por dichos receptores frente al estrés oxidativo y la retirada de factores tróficos.

Por otro lado, ambos receptores también están acoplados a la señalización de las proteínas MAP quinasas ERK1/2, promoviendo la supervivencia frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato (Ortega y cols., 2008, 2009, 2010, 2011; Espada, 2010). Dada la importancia de las cascadas de las MAP quinasas en la diferenciación y supervivencia neuronal, nos centramos en analizar cuál sería el comportamiento de los nucleótidos en situaciones en las que estas rutas de señalización estuvieran desreguladas. Esta situación está asociada con un tipo de estímulos dañinos que tienen en común la inducción de estrés genotóxico, como la exposición a la luz UV, y a las drogas citotóxicas, camptotecina y cisplatino.

Más allá del posible efecto neuroprotector de los nucleotídicos, nos interesó el estudio de los mecanismos de activación-desactivación de las MAP quinasas, concretamente a nivel de las proteínas fosfatasas de especificidad dual (DUSP), ya que representan un importante mecanismo de retroalimentación negativa y regulan tanto la intensidad como la duración de la señalización de las MAP quinasas, contribuyendo de ese modo a una correcta homeostasis celular.

Estos antecedentes nos llevaron al planteamiento de los objetivos que se han desarrollado durante la realización de la presente Tesis Doctoral.

1. Análisis de la activación a lo largo del tiempo de las principales rutas de las MAP quinasas, ERK1/2, p38-MAPK y JNK en respuesta a distintos tipos de estímulos genotóxicos en neuronas granulares de cerebelo, como la luz ultravioleta, camptotecina y cisplatino.
2. Estudio del efecto de la activación de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 en la señalización de las MAP quinasas en condiciones de exposición a los agentes genotóxicos.

3. Identificación y análisis de las proteínas fosfatasas de especificidad dual que modulan la actividad de MAP quinasas a través de la activación de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7.
4. Investigación del posible efecto neuroprotector de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 frente al daño genotóxico e implicación de su acción sobre las fosfatasas de especificidad dual.

# *Material y Métodos*







## 1. MATERIAL.

### 1.1. Material biológico.

En esta Tesis Doctoral se emplearon cultivos de neuronas granulares de cerebelo procedentes de ratas Wistar (machos y hembras) de 7 días de vida. Todos los animales fueron suministrados por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y utilizados según la normativa internacional para animales de laboratorio (ICLAS).

### 1.2. Instrumentación.

Los instrumentos utilizados en la realización de esta Tesis Doctoral están recogidos en la Tabla 6.

**Tabla 6. Relación de los diferentes aparatos utilizados.**

<b>Categoría y uso</b>	<b>Instrumentación y modelo</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Instrumentación general</b>	Granatario FX2000 Balanza de precisión ER60 Agitadores magnéticos Agimatic-S Agitadores orbitales Luckham 802 pHmetros Pipetas automáticas Sistemas de filtración Mili-Ro y Mili-Q Microfuga 5414D Centrífugas 5804 R y Onmifuge 2.0 RS Centrífuga refrigerada RC5C Neveras 4°C Congeladores -20°C Congelador -80°C Baños termostatizados Tectron 3473100 Calentadores multibloque Thermomixer Compact	AND AND Selecta Labnet Crison Eppendorf y Gilson Millipore Eppendorf Eppendorf y Heraeus Sorvall Premium Liebeher Forma Scientific Selecta Eppendorf
<b>Cultivos celulares</b>	Campana de flujo laminar vertical Gelaire Twin 30 y TC48	Cultek

	Autoclave de alta capacidad Presoclave-2 Autoclave de baja capacidad CV II/1600 Placas Petri estériles Cubreobjetos de vidrio Ø 15 mm Pipetas de aspiración Pipet-Aid Pipetas estériles Incubadores B-5060-EK y NAPCO 5415 Filtros estériles Raspadores celulares estériles Botellas Jeringas estériles Cámara de Neubauer 0.0025 mm <sup>2</sup> Microscopio óptico HM-LUX 3 Microscopio de contraste de fase Wetzlar 21-D6330 Microscopio confocal TCS SPE	Selecta Certoclav Falcon Deckgläser Drummond Costar Heraerus Millipore Biologix Falcon Falcon Deltalab Leitz Wilovet Leica
<b>Expresión génica</b>	Termociclador Gene Amp2400 Termociclador de PCR a tiempo real Step One Plus Espectrofotómetro Biophotometer Plus Transiluminador Gel Logic 200 Imagin System Medidor de RNA TrayCell	Applied Biosystems Applied Biosystems Eppendorf Kodak Hellma
<b>Inmunotransferencia</b>	Equipo de electroforesis Mini- PROTEAN® Tetra Cell Equipo de transferencia Mini Trans- Blot® Electrophoretic Transfer Cell Equipo de revelado de autoradiografías CP1000 Detector de quimioluminiscencia LAS 500 Membranas de transferencia PVDF Películas radiográficas	Bio-Rad Bio-Rad Agfa GE Healthcare GE Healthcare Afga

### 1.3. Reactivos.

Todos los medios y soluciones se prepararon con sales inorgánicas Merck de grado analítico (pro anal.) disueltas en agua desionizada de alta calidad y pureza. En la Tabla 7 se detallan los compuestos y reactivos utilizados en cada uno de los ensayos realizados, así como las casas comerciales que los suministraron. En general, cualquier sustancia no especificada en las tablas fue proporcionada por Sigma-Aldrich o Merck.

Tabla 7. Relación de compuestos y reactivos utilizados.

Categoría y uso	Reactivos	Casa comercial
<b>Cultivos de neuronas granulares</b>	Neurobasal, Suplemento B27 Papaína, DNAsa, Ovomucoide EBSS, glutamina, AraC, solución de antibióticos/antimitóticos, azul tripán Poli-L-lisina	Gibco Worthington Sigma Biochrom AG
<b>Experimentos de PCR</b>		
<i>Extracción y limpieza de ARN</i>	SpeedTools Total RNA Extraction Kit Turbo DNA free	Biotools Ambion
<i>Geles</i>	Agarosa SYBR-Save DNA gel stain	Sigma Molecular Probes
<i>RT</i>	TaqMan® RT reagents	Applied Biosystems
<i>PCR</i>	JumpStar™ Taq DNA Polymerase	Sigma
<i>Q-PCR</i>	LuminoCt® Qpcr Ready Mix™	Sigma
<i>Inhibidores de ARNsas</i>	DEPC Rnase-Zap	Fluka Chemie Sigma
<i>Marcadores</i>	Patrón de ADN (PCR 100 bp Low ladder)	Sigma
<b>Farmacología</b>		
<i>Agonistas y antagonistas purinérgicos</i>	ATP, 2MeSADP, BzATP, MRS-2179, MRS-2211, A-438079, BBG, $\alpha,\beta$ -meATP	Sigma, Tocris

<i>Sustancias citotóxicas e inhibidores de proteínas implicadas en vías de señalización</i>	Cisplatino, Camptotecina, Ortovanadato, SB202190, SP600125, U0126	Sigma, Calbiochem
<i>Otros agonistas y antagonistas</i>	Ácido okadaico BDNF EGF	Calbiochem Protech Sigma
<b>Ensayos de viabilidad</b>	Kit de ensayo de toxicología <i>in vitro</i> basado en el MTT	Sigma
<b>Inmunotransferencia/ inmunocitoquímica</b>		
<i>Extracción y cuantificación de proteínas</i>	MOPS, NaF, B-glicerol fosfato, Ortovanadato, EDTA, EGTA Complete (inhibidor de proteasas) Tritón X-100	Sigma Roche Merck
<i>Electroforesis y transferencia</i>	Persulfato amónico, Bis-acrilamida, SDS, Temed, Glicina, Patrones de peso molecular conocido y $\beta$ -mercaptoetanol Tris, azul de bromofenol Metanol Membranas de PVDF BSA, Tween-20 Patrones de proteínas (Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range y Precision Plus Protein Standards)	Bio-Rad Merck Carlo-Erba GE Healthcare Sigma Bio-Rad
<i>Anticuerpos primarios</i>	Anti P-p38-MAPK (Thr180/Tyr182) (conejo) Anti-p38-MAPK (conejo) Anti P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (conejo) Anti Cleaved Caspase-3 (Asp175) (conejo) Anti-DUSP6/MKP3 (conejo) Anti-P-ERK1/2 (E-4) (ratón) Anti ERK-2 (D-2) (ratón) Anti PAC-1 (A-19) (cabra)	Cell Signaling Cell Signalling Cell Signaling Cell Signaling Cell Signaling Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz Biotechnology Santa Cruz Biotechnology

<i>Anticuerpos secundarios</i>	Anti- $\beta$ -III-tubulina (ratón)	Sigma
	Anti-GAPDH (ratón)	Sigma
	Anti-IgG de conejo-HRP (cabra)	DakoCytomation
	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo)	DakoCytomation
	Anti-IgG de cabra-HRP (conejo)	DakoCytomation
	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo/burro)	Santa Cruz Biotechnology
	Anti-IgG de conejo-Cy3 (burro)	Jackson
<i>Revelado de membranas</i>	Alexa 488 anti-IgG de ratón (cabra)	Invitrogen
	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific

## 2. MÉTODOS.

### 2.1. Obtención y cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata.

El cultivo de neuronas granulares de cerebelo se obtuvo a partir de ratas Wistar de 7 días de vida siguiendo el método descrito por Meyer-Franke y cols. (1995) y modificado posteriormente por Pons y cols. (2001), que se ha ilustrado esquemáticamente en la Figura 24.

Para cada cultivo se emplearon grupos de 6 ratas Wistar. Los animales se sacrificaron por decapitación utilizando tijeras estériles. Posteriormente los cerebelos se extrajeron con ayuda de unas pinzas de microdissección estériles, se introdujeron en medio de aislamiento, compuesto por cloruro sódico (NaCl) 130 mM, cloruro potásico (KCl) 4 mM, bifosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 10 mM, ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)]-etanosulfónico (HEPES) 10 mM, glucosa 15 mM, sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) 1.5 mM, completado con albúmina de suero bovino (BSA) 50  $\mu\text{M}$ , penicilina 50 U/mL y estreptomicina 50 mg/mL, cuya preparación se realizaría en el interior de una campana de flujo laminar. Los cerebelos se pasaron uno a uno a una placa de 35 mm de diámetro, con unas gotas de medio de aislamiento para evitar la desecación del tejido, donde se eliminaron cuidadosamente con unas pinzas estériles todos los restos de meninges, materia blanca y vasos sanguíneos que acompañaban a los cerebelos. Una vez completamente limpios se procedió a la disgregación mecánica de los cerebelos con ayuda de unas pinzas y tijeras estériles, dejando el tejido en fragmentos de aproximadamente 1 mm. Estos fragmentos se recogieron con una pipeta pasteur de plástico de 3 mL, se pasaron a un tubo cónico de 50 mL completando con medio de aislamiento hasta un volumen de unos 5-10 mL y se dejaron sedimentar durante uno o dos minutos. Tras este paso se retiró el sobrenadante y se filtraron sobre los fragmentos de cerebelo 10 mL de EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) conteniendo DNAsa 100 U/mL, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1 mM, cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 1 mM, cisteína 5 mM, ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) 2 mM y 65,6 unidades (U) de papaína, que se había activado previamente incubando la solución en una atmósfera a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 30 minutos.

El tubo se cerró herméticamente y se mantuvo en agitación durante 45 min a 37 °C y 250 revoluciones por minuto (rpm) para que se efectuara la disgregación química del tejido por medio de la papaína. Durante este tiempo se prepararon

dos tubos cónicos de 15 mL con 3 mL de ovomucoide 10 mg/mL, el inhibidor de la papaína.

Una vez que la incubación hubo concluido, se pasó el contenido del tubo varias veces por una pipeta pasteur de vidrio previamente esterilizada para terminar de disgregar el tejido. Durante este paso se añadieron 600 µL de ovomucoide para iniciar la inactivación de la papaína. Tras la disgregación se dejó reposar el contenido del tubo durante unos minutos para que los fragmentos de tejido no disgregado sedimentaran, después se recogió el sobrenadante, se pasó a un tubo cónico nuevo y se centrifugó durante 5 minutos a 208 x g. Se retiró el sobrenadante y el precipitado formado por las células se resuspendió en 6 mL de EBBS y se hizo pasar poco a poco por la pared de los tubos cónicos de ovomucoide, que habían sido previamente agitados para formar un gradiente de espuma. Después de esto se centrifugó a 172 x g durante 5 min y el precipitado se resuspendió finalmente en 2 mL de medio Neurobasal (suplementado con B-27 al 2% (v/v), KCl 20 mM, glutamina 0.5 mM y solución antibiótica/antimitótica 100X que contenía 100 U/mL de penicilina, 0.1 mg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina por tubo). Una vez resuspendido se procedió a determinar el número de células vivas obtenidas por medio de su recuento en una cámara de Neubauer, utilizando como colorante vital el Azul de Tripán. Para ello se diluyeron 20 µL de la suspensión celular en 180 µL de medio Neurobasal (dilución 1:10). Posteriormente se mezclaron 50 µL de esta solución con 50 µL de Azul de Tripán (1:1 v/v) y se llevó a la cámara de Neubauer para el recuento bajo microscopio óptico. Se consideraron como células viables solo aquellas capaces de excluir el colorante, contándose por tanto sólo las células no azules.

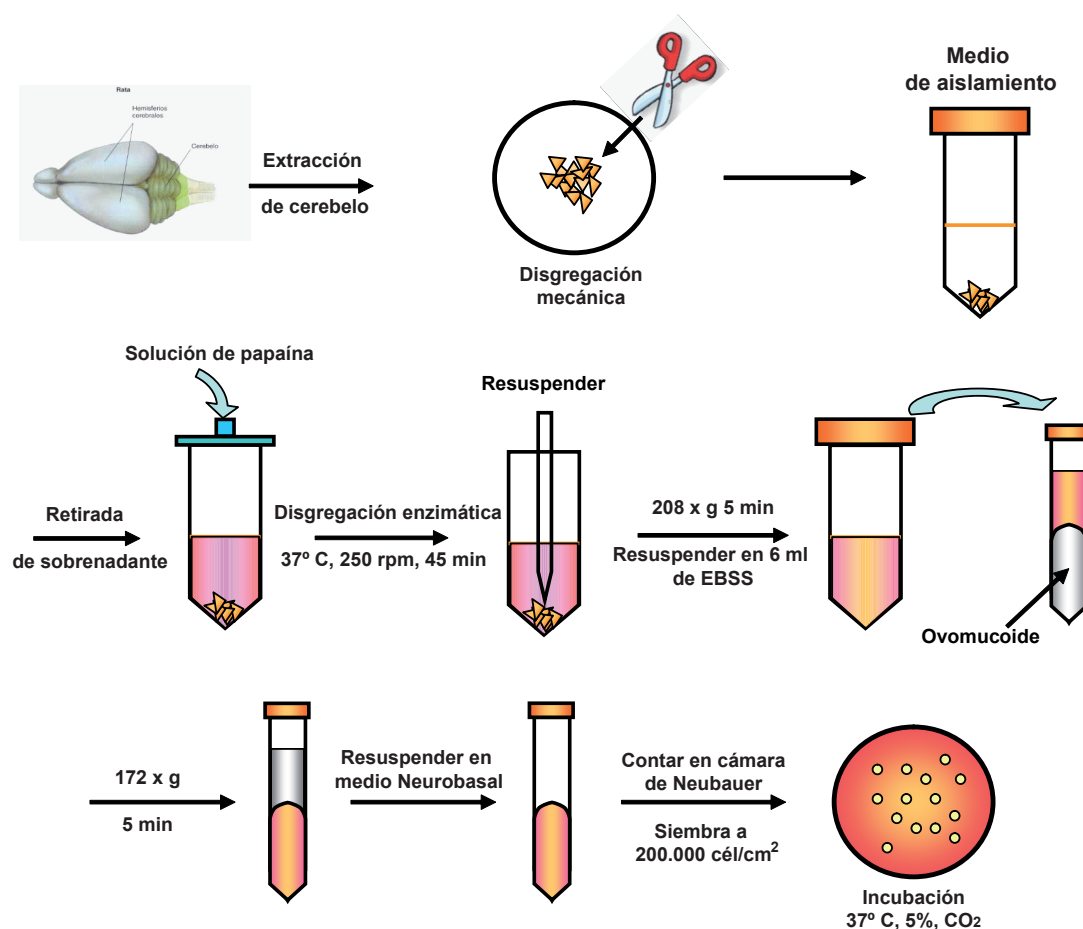
El número de células por mL se estimó según la relación:

$$\text{Nº células/mL} = \text{nº células contadas} \times 10^4 \times \text{factor de dilución de la cámara de Neubauer}$$

Tras el recuento las células se llevaron al volumen total necesario con medio Neurobasal completo para obtener la densidad celular deseada. Las células se sembraron a una concentración de 200.000 células/cm<sup>2</sup> sobre placas petri y multipocillo de plástico estériles o cubreobjetos de vidrio de 12 y 15 mm de diámetro y 0,15 mm de grosor, que previamente habían sido tratados con una solución de poli-L-lisina. La poli-L-lisina utilizada tenía una concentración de 0.1 mg/mL y fue diluida en PBS (dilución 2:1) (en el caso de los cubreobjetos se empleó solución de poli-L-lisina sin diluir). La poli-L-lisina diluida se filtró y posteriormente se trataron con ella tanto las placas como los cubreobjetos durante



aproximadamente dos horas a temperatura ambiente, seguidamente se lavó tres veces con agua estéril para eliminar los restos de poli-L-lisina, y se dejaron secar. Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a temperatura de 37 °C, con atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> y saturada de humedad. A las 24 horas se realizó un cambio total de medio y se añadió el antimitótico AraC (citosina arabinósido) a una concentración de 10 µM, para evitar la proliferación de células de origen glial. Bajo estas condiciones, se obtuvo un porcentaje de neuronas granulares superior al 95% sobre la población total en los cultivos. Finalmente, las células fueron procesadas entre los 8 y 10 días de cultivo (8-10 DIV, días *in vitro*).



**Figura 24.** Representación esquemática del cultivo de neuronas granulares de cerebelo de rata.

## **2.2. Estudios de expresión génica.**

### **2.2.1. Obtención de las muestras.**

Los experimentos de RT-PCR y PCR cuantitativa se realizaron a partir de cultivos de neuronas granulares mantenidos durante 8-10 DIV. La manipulación del ARN tuvo lugar en todo momento en condiciones libres de ARNsas. El procedimiento de extracción de ARN se realizó con un kit cuyo fundamento está basado en la capacidad de unión del ARN a una columna de gel de sílice en presencia de una elevada concentración de sales (SpeedTools Total RNA Extraction Kit, Biotools). Se emplearon raspadores celulares estériles para levantar las células de las placas de 60 mm de diámetro a una densidad de  $6 \times 10^6$  células/placa y se utilizaron 300  $\mu\text{L}$  de tampón desnaturizante (conteniendo isotiocianato de guanidina y  $\beta$ -mercaptoetanol 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) para obtener el lisado celular.

Las muestras una vez disgregadas, se pasaron varias veces a través de agujas estériles de tamaño 20-G (0,9 mm de diámetro) para completar la homogeneización y disminuir la viscosidad del lisado. A continuación, se añadió un volumen igual de etanol al 70%, para conseguir las condiciones óptimas de unión. Las muestras se centrifugaron a  $8.000 \times g$  en columnas que contenían la membrana de sílica gel a las que se unen por adsorción las moléculas de ARN mayores de 200 nucleótidos, quedando los ARN 5,8S, 5S y de transferencia en el eluido.

Después de cada extracción y de forma rutinaria las muestras de ARN se trataron con ADNsa RQ1 de acuerdo con el kit Turbo DNA free (Ambion) para eliminar la posible contaminación del ARN con ADN genómico, durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . A continuación se añadió el reactivo de inactivación de ADNsa y se centrifugó a  $10.000 \times g$ , recogiendo el sobrenadante que contiene el ARN.

### **2.2.2. Determinación de la concentración y grado de pureza del ARN extraído.**

La concentración de ARN en las muestras extraídas se determinó midiendo los valores de absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a 260 nm con la ayuda del accesorio TrayCell (Hellma) que nos permite medir directamente la muestra.

El grado de pureza del material extraído se estimó a partir del cociente entre la Absorbancia de la muestra medida a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) el cual,

para una disolución de ARN puro, debe tener un valor igual o muy próximo a 2.

### **2.2.3. Reacción de la transcriptasa inversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en dos fases. Una primera fase que consistía en la síntesis de la primera cadena de ADNc a partir del ARN purificado y una segunda fase en la que la DNA polimerasa amplificaba esta primera cadena de ADN.

Para la formación de la primera cadena de ADN se añadieron en el tampón de reacción y para un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  por tubo: 1.25 U/mL de transcriptasa inversa, oligo(dT)<sub>16</sub> 2.5  $\mu\text{M}$ , 0.5 U/ $\mu\text{L}$  de inhibidor de ARNasa,  $\text{MgCl}_2$  5.5 mM, la mezcla de dATP/dCTP/dGTP/dUTP (0.5 mM cada uno), todo en el kit TaqMan® RT reagents de Applied Biosystems, y 1  $\mu\text{g}$  de ARN purificado. La transcripción inversa se realizó durante 10 minutos a 25 °C, 45 minutos a 48 °C seguido de 5 minutos a 95 °C para inactivar la transcriptasa inversa.

En las reacciones de PCR utilizamos el ADN polimerasa JumpStar™ Taq en presencia de 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , la mezcla de dNTPs (0.2 mM cada uno), la pareja de oligonucleótidos específicos (900 nM cada uno) y 1-5  $\mu\text{L}$  del producto de la reacción de la transcriptasa inversa anterior, en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ .

En todos los casos, la reacción de amplificación se inició incubando la mezcla a 95 °C durante 10 minutos para la activación de la DNA polimerasa JumpStar™ Taq, y a continuación se repitieron 40 ciclos en las condiciones de desnaturalización, anillamiento y elongación (95 °C, 60 segundos; 60 °C 45 segundos; 72 °C, 45 segundos). Una vez completado el número total de ciclos, se realizó un paso de extensión final manteniendo la mezcla durante 7 minutos a 72 °C para facilitar la completa elongación de todos los fragmentos amplificados durante la reacción de PCR.

Cada reacción de PCR se realizó en paralelo con un control sin ADNc molde. Además, para cada nueva muestra de ARN se realizó una reacción de RT en la que no se añadió la transcriptasa inversa, para comprobar si existía contaminación con ADN genómico en la muestra. Así, en todo momento se podía tener la seguridad de que los fragmentos amplificados en cada reacción correspondían a secuencias del ARNm presente en las células.

Las reacciones de retrotranscripción y amplificación por PCR a tiempo final se llevaron a cabo en el termociclador GeneAmp 2400 de Applied Biosystems. La separación e identificación de los productos resultantes de la amplificación se

realizó en geles de agarosa al 2%, teñidos con SYBR Safe (Molecular Probes). Como marcador de tamaños moleculares conocidos se utilizó el patrón de ADN comercial PCR 100 bp Low ladder (Sigma). Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante el sistema de captación de imágenes Gel Logic 200 Imagin System (Kodak) con luz ultravioleta.

#### **2.2.4. Amplificación por PCR a tiempo real (PCR cuantitativa en tiempo real).**

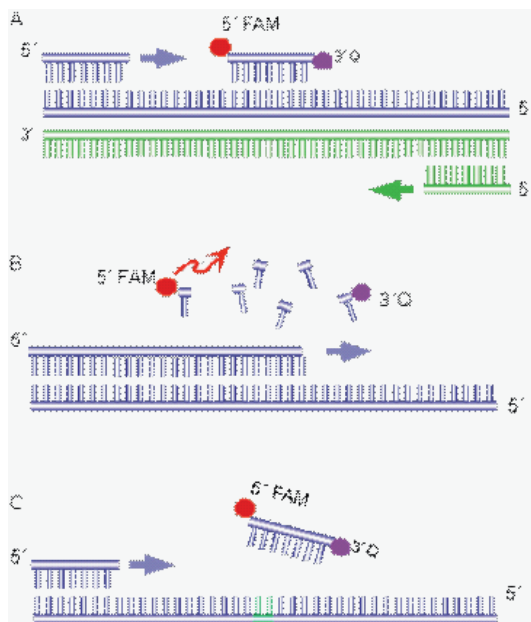
Este método permite detectar la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción. El uso de esta técnica para cuantificar el material genético de una muestra está basado en la relación directa que existe entre la cantidad de ADN molde inicial y el producto que se amplifica a partir del mismo. De esta forma a mayor cantidad de ADN molde, más temprana será la aparición del producto amplificado.

El seguimiento del proceso de amplificación se realiza mediante el uso de sistemas de marcado fluorescente que permiten detectar los productos que se van sintetizando durante el transcurso de la reacción. Así, la cantidad de fluorescencia emitida por el producto en cuestión incrementa en cada ciclo de amplificación. La reacción se lleva a cabo en termocicladores diseñados con un sistema capaz de monitorizar y cuantificar la señal de fluorescencia emitida.

Existen diversos sistemas de marcaje fluorescente que permiten la detección y cuantificación en las reacciones de PCR a tiempo real. Uno de los más utilizados es el sistema con sondas de hibridación TaqMan®. Este sistema se basa en la utilización de un tercer oligonucleótido (sonda) que hibrida de forma específica con el amplicón deseado en una región interna del mismo, el cual queda localizado entre los cebadores sentido y antisentido. La sonda está marcada en el extremo 5' con un fluoróforo (*reporter*) que requiere una luz de excitación de alta energía y en el extremo 3' con otro fluoróforo diferente (*quencher*), que requiere una luz de excitación de baja energía y que absorbe la emisión de fluorescencia del extremo 5'. Por tanto, cuando la sonda está intacta no emite señal fluorescente.

Al inicio de la reacción de PCR, los dos oligonucleótidos y la sonda hibridan en la región diana de ADN molde y la Taq DNA polimerasa comienza el proceso de amplificación. Durante el proceso de extensión de la cadena que se está sintetizando, la ADN polimerasa termoestable, por su actividad 5'-3' exonucleasa, hidroliza la sonda en su extremo 5'. De esta forma el fluoróforo *reporter* se libera, la fluorescencia que emite no es extinguida por el *quencher* y

su emisión puede ser detectada por el sistema. Los fragmentos de sonda son entonces desplazados del molde y la polimerización de la nueva cadena continúa (Figura 25). La extensión de la sonda durante el proceso de síntesis se evita al estar su extremo 3' bloqueado. El proceso de hibridación e hidrólisis de la sonda ocurre en cada ciclo y no interfiere en la acumulación exponencial del producto.

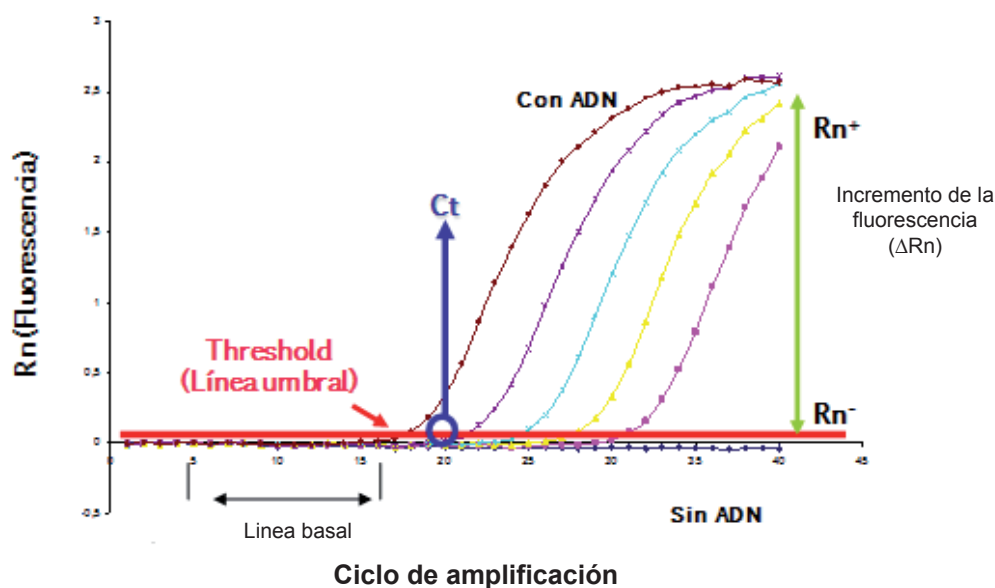


**Figura 25. Esquema de los sucesos que tienen lugar durante el desarrollo de una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.** FAM: fluoróforo *reporter*; Q: fluoróforo *quencher*.

La acumulación de los productos amplificados durante la PCR se detecta monitorizando el aumento de fluorescencia que se produce como consecuencia de la liberación del fluoróforo situado en el extremo 5' de la sonda. A medida que los ciclos de la reacción avanzan, aumenta el número de copias de producto generado, por lo que la intensidad de la fluorescencia emitida aumentará también de forma proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado. El termociclador detecta el incremento de fluorescencia ( $\Delta R$ ) y lo representa frente al número de ciclos de la PCR (Figura 26). Durante los primeros ciclos de amplificación no hay incremento de fluorescencia ya que es necesario que se acumule una cantidad mínima de producto amplificado para que la fluorescencia detectada por el sistema sea significativamente distinta del valor de fluorescencia basal. El ciclo de PCR en el que se acumula suficiente producto amplificado y el valor de fluorescencia se eleva por encima de la fluorescencia basal, se define como ciclo umbral o Ct (Cycle threshold). El valor del Ct es proporcional al logaritmo de la cantidad inicial de ADN molde.

Los ensayos de cuantificación de la expresión génica se llevaron a cabo mediante la amplificación por PCR en tiempo real de las muestras de ADNc

obtenidas por retrotranscripción a partir de los mensajeros correspondientes. Los ADN complementarios se obtuvieron mediante el ensayo de transcriptasa inversa descrito en el apartado anterior.



**Figura 26. Modelo de las curvas obtenidas en una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real.** La línea roja indica la línea basal o threshold. En azul se muestra el punto considerado como el valor de Ct. Este valor coincide con el número de ciclos de amplificación en la reacción de PCR necesarios para iniciarse el incremento exponencial de fluorescencia (Rn).

Las reacciones de RT-PCR cuantitativa se realizaron usando el sistema StepOne Plus Real Time PCR de Applied Biosystems utilizando el kit de amplificación LuminoCt® Qpcr Ready Mix™ de Sigma. Se utilizaron sondas fluorescentes de Roche marcadas con el fluoróforo FAM en el extremo 5' y en el 3' con NFQ-MGB.

DUSP2, DUSP6 y GAPDH se diseñaron a partir de la base de datos de las librerías Universal ProbeLibrary de Roche que son los que se muestran en la Tabla 8.

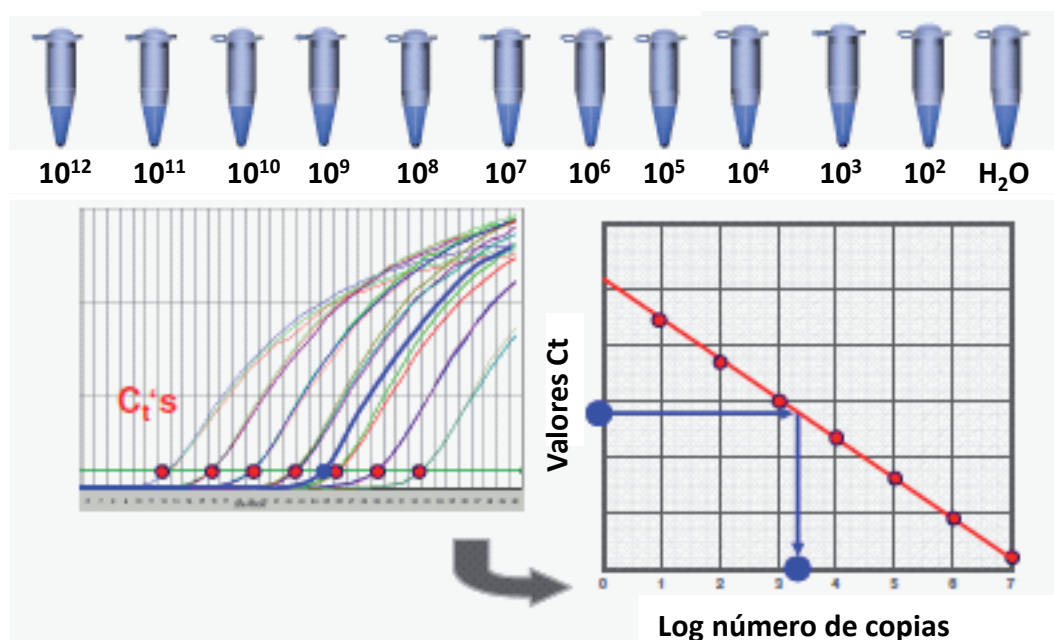
**Tabla 8. Secuencias de las parejas de oligonucleótidos cebadores empleados en la amplificación.** Nt: nucleótidos. N° cat.: número de catálogo.

Gen	Forward primer	Reverse primer	Sonda	Secuencia sonda	Amplicon
DUSP2	AGGCTATCGGCTTCATTGAC	TCGATGGCTCTGAATCAGGT	#83 (N° cat. 04689062001)	No proporcionado por la casa comercial	119 nt
DUSP6	TCTCTGATCACTGGAGCCAAA	GTTTTGCCTCGGGCTTC	#123 (N° cat. 04693574001)	CTGTCCA	80 nt
GAPDH	CCCCTCTGGAAGCTGTG	GGATGCAGGGATGTTCT	#43 (N° cat. 04688031001)	TGGGGCAG	61 nt



El ensayo de amplificación se llevó a cabo en placas multipocillo en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ , conteniendo 12.5  $\mu\text{L}$  de la mezcla LuminoCt® Qpcr Ready Mix™ (incluye los dNTPS, tampón de reacción y Jumpstar Taq ADN polimerasa), 1.25  $\mu\text{L}$  de cada cebador y sonda correspondiente, 2.5  $\mu\text{L}$  de ARNt ([30 ng/mL]f), 0.25  $\mu\text{L}$  de colorante de referencia pasiva (ROX), 1  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura estéril, y 5  $\mu\text{L}$  del ADNc obtenido tras las RT. La reacción se desarrolló en 20 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C y de hibridación de 30 segundos a 60 °C.

La cuantificación de los genes se realizó mediante extrapolación en una recta patrón. Para la realización de la recta patrón hicimos diluciones seriadas de un producto amplificado por una PCR clásica que suponemos posee alrededor de  $10^{12}$  copias del fragmento de estudio. En la curva patrón se representa el logaritmo del número de copias obtenido de cada dilución del gen de interés con el valor de Ct obtenido tras la amplificación. Siempre se trabajó con curvas patrones cuyos coeficientes de correlación eran mayores de 0,98 y que daban una eficiencia de amplificación cercana al 100% para todos los genes. Como control interno de la cantidad total de ADNc añadida se utilizó el gen de expresión constitutiva GAPDH. Finalmente, los resultados se expresaron como aumento o disminución de la expresión con respecto a la condición control, en ausencia de estimulación (Figura 27).



**Figura 27. Modelo de curva patrón obtenida en PCR cuantitativa real.** Representación del logaritmo del número de copias obtenido de cada dilución del gen de interés con el valor de Ct obtenido tras la amplificación.



## **2.3. Inmunotransferencia.**

### **2.3.1. Extracción de proteínas totales.**

Para la extracción de proteína totales se utilizaron neuronas granulares de cerebelo que habían sido previamente sembradas en placas de 60 mm de diámetro a una concentración de aproximadamente  $6 \times 10^6$  células por placa. Estas neuronas se mantuvieron en entre 8 y 10 días en cultivo. Una vez realizado el experimento, se retiró en su totalidad el medio y se añadieron a las placas de 60 mm de diámetro 200  $\mu$ L de tampón de lisis frío, cuya composición es la siguiente: ácido morfolino-propano-sulfónico (MOPS) 20 mM, fluoruro de sodio (NaF) 50 mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 40 mM, ortovanadato 1mM, EDTA 5 mM, ácido etilen-glicol-tetra-acético (EGTA) 2 mM, 0,5% (v/v) Triton X-100, los inhibidores de proteasas (Cóctel Complete de inhibidores de proteasas de la casa comercial Roche) y 0.2 mg/ml de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF).

Las células se rasparon en frío en este tampón utilizando raspadores celulares estériles y el lisado obtenido se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a  $16100 \times g$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante, donde se encontraban las proteínas totales solubilizadas.

### **2.3.2. Cuantificación de proteínas.**

La cuantificación de la concentración de proteínas presente en los extractos totales se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). La cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante un ensayo estándar. Este método se basa en el cambio de la absorbancia máxima que experimenta el azul de Coomassie cuando se une a las proteínas, pasando de 465 nm a 595 nm.

Como patrón se utilizó la albúmina de suero bovino (BSA), construyéndose una recta patrón con los valores de absorbancia a 595 nm de esta proteína para diferentes diluciones conteniendo entre 0 y 75  $\mu$ g de BSA, preparadas a partir de diluciones iniciales de 10 mg/mL. Para calcular la concentración de proteínas se ajustaron las mezclas problema a un volumen de 100  $\mu$ L y se mezclaron con 5 mL del reactivo comercial Bradford de Bio-Rad que se había diluido 5 veces previamente. Se midió la absorbancia a 595 nm de la mezcla en el espectrofotómetro y se obtuvieron los valores de concentración de proteínas interpolando los resultados en la recta patrón.

Una vez conocidas las concentraciones de proteínas presentes en cada una de nuestras muestras se realizaron los cálculos necesarios para cargar la misma

cantidad de proteína en cada uno de los pocillos del gel de electroforesis.

### 2.3.3. Electroforesis, transferencia de proteínas y revelado de membranas.

Como primer paso se mezclaron tres volúmenes de los extractos de proteínas solubilizadas con un volumen de tampón de carga concentrado 4 veces y cuya composición es la siguiente: glicerol al 50% (v/v), Tris-ácido clorhídrico (Tris-HCl) 125 mM pH 6.8, sodio-dodecil-sulfato (SDS) al 20% (v/v), azul de bromofenol al 8% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% (v/v) (éste último añadido justo en el momento de utilización). Una vez bien mezcladas, las muestras se calentaron a 100 °C durante 4 minutos en un calentador multibloque y posteriormente se centrifugaron a 16100 x g durante un minuto. Estas muestras se cargaron en geles de poliacrilamida del 12% (p/v) de diez o quince pocillos, reservándose uno de estos pocillos para cargar la mezcla de patrones coloreados de peso molecular conocido. La electroforesis se llevó a cabo utilizando un sistema mini-Protean 3 de Bio-Rad, durante aproximadamente 120 minutos a un voltaje constante de 120 voltios y 4 °C de temperatura, empleándose un tampón de electroforesis cuya composición es la siguiente: 25 mM Tris, 200 mM glicina y 0.1% SDS, a un pH aproximado de 8.3.

Una vez las proteínas fueron separadas en función de su peso molecular por medio del proceso electroforético los geles se equilibraron en tampón de transferencia durante 30 minutos. La composición de este tampón de transferencia es la siguiente: glicina 192 mM, Tris 25 mM y de metanol al 20% (v/v), a un pH aproximado de 8.3. Del mismo modo se hidrataron y equilibraron las membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF) que se iban a emplear en la transferencia de las proteínas de los geles. Para ello se introdujeron estas membranas durante 30 segundos en metanol, seguidos de 5 minutos en agua destilada y 30 minutos en tampón de transferencia. La transferencia de proteínas se llevó a cabo empleando un sistema mini-Trans Blot de Bio-Rad, a una intensidad de 240 mA durante 80 minutos a 4 °C.

Una vez que las proteínas se habían transferido a las membranas de PDVF, estas se bloquearon con una solución para tal efecto, con un tampón salino de Tris (TBS) compuesto de Tris 10 mM, NaCl 100 mM a un pH de 7,5. Además, la solución de bloqueo contenía Tween-20 al 1% (v/v) y 5% de leche desnatada deshidratada o 3% de BSA, durante una hora a temperatura ambiente en un agitador orbital. Una vez concluido el bloqueo las membranas se incubaron con los anticuerpo primarios correspondientes en tampón TBS-Tween-20 al 0.1% con leche desnatada deshidratada al 5% o BSA al 3% durante toda la noche a 4 °C. La

relación de los anticuerpos empleados y las concentraciones utilizadas pueden verse en la Tabla 9.

**Tabla 9. Anticuerpos primarios, secundarios y diluciones empleadas en los experimentos de inmunotransferencia.**

Anticuerpo primario	Dilución empleada	Anticuerpo secundario	Dilución empleada
Anti-P-ERK1/2 (E-4) (ratón)	1:1000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo/burro)	1:4000
Anti-ERK-2 (D-2) (ratón)	1:1000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo/burro)	1:4000
Anti-P-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (conejo)	1:2000	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti-p38-MAPK (conejo)	1:1000	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti-P-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (conejo)	1:1000	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti-DUSP6/MKP3 (conejo)	1:500	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:1000
Anti-DUSP2/PAC-1 (cabra)	1:500	Anti- IgG de cabra-HRP (conejo)	1:1000
Anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175)(conejo)	1:500	Anti- IgG de conejo-HRP (cabra)	1:500
Anti- $\beta$ III-Tubulina (ratón)	1:10000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo)	1:5000
Anti-GAPDH (ratón)	1:5000	Anti-IgG de ratón-HRP (conejo)	1:5000

Tras este paso, el exceso de anticuerpo se lavó con tampón TBS-Tween al 0,1% y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios adecuados ligados a peroxidasa (anti-IgG HRP de ratón o conejo, en función del anticuerpo primario utilizado) (Tabla 9). Esta incubación se llevó a cabo en tampón TBS-Tween 20 0,1% con BSA al 3%, a temperatura ambiente en agitador orbital durante una hora. El exceso de anticuerpo secundario se lavó empleando tampón TBS-Tween 20 0,1% y el revelado se llevó a cabo incubando la membrana durante 5 minutos con el kit Super Signal substrate Western Blotting de la casa comercial PIERCE. Este sistema se basa en la oxidación que la peroxidasa ligada al anticuerpo secundario ejerce sobre el luminol, presente en el kit, generando la emisión de luz que puede ser detectada por las películas radiográficas o sistemas de imagen. En este trabajo se emplearon películas radiográficas Agfa que fueron reveladas en una máquina Agfa CP1000. La densidad de marcaje inmunoreactivo se llevó a cabo, en ambos casos, empleando un programa específico denominado Image J.

#### **2.4. Inmunocitoquímica.**

Para los estudios de inmunocitoquímica se emplearon neuronas mantenidas en cultivo durante 7-10 días *in vitro* (DIV) en cubreobjetos de 12 y 15 mm. Estos cubreobjetos se lavaron en tampón salino de fosfato (PBS) durante 5 minutos y seguidamente se fijaron en solución de paraformaldehído al 4% en PBS a pH 7.2 durante 15 minutos. Después del fijado se lavaron dos veces con

PBS y se bloquearon los cubreobjetos durante una hora a 37 °C. La solución de bloqueo empleada estaba compuesta por PBS al que se le había añadido BSA al 3%, tritón X-100 al 0.1%, y 5% de suero de cabra o de burro en función de en qué animal habían sido desarrollados los anticuerpos secundarios que fuéramos a utilizar en el experimento. Tras el bloqueo se llevaron a cabo 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-BSA al 3% y se incubó con el anticuerpo primario durante una hora a 37 °C o bien a 4 °C durante toda la noche. A continuación se realizaron tres lavados en PBS-BSA 3%, 0,1% Tritón X-100, para eliminar el exceso de anticuerpo primario. El marcaje se reveló incubando las preparaciones con los anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos (FITC o Cy3) durante una hora a 37° C. Posteriormente a la incubación se realizaron dos lavados con PBS-BSA 3%, Tritón X-100 al 0,1%. En los casos en que los núcleos celulares fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración 1 µM, éste se añadió tras el segundo lavado y se mantuvo durante 5 minutos a temperatura ambiente, lavándose después los cubreobjetos con PBS para su eliminación. Por último, se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando como medio de montaje el Prolong Antifade de Molecular Probes, que reduce el apagamiento de los fluorocromos. Tras dejar secar el medio de montaje, los portaobjetos se almacenaron en oscuridad a 4 °C hasta su estudio. Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron en el microscopio confocal de Leica modelo TCS SPE, controlado con el software Leyca LAS AF versión 2.5.1.5757. El procesamiento posterior de las imágenes adquiridas se realizó con el programa Image J.

## **2.5. Tratamiento de los cultivos de neuronas granulares de cerebelo.**

Los experimentos de inducción de apoptosis por exposición a agentes genotóxicos, fueron realizados sobre neuronas mantenida en cultivo durante 7-10 DIV sembradas en placas de 6 y 12 pocillos a, llevándose a cabo las incubaciones de los distintos tratamientos directamente sobre el medio de cultivo completo. Los agonistas nucleotídicos 2MeSADP (1 µM), BzATP (300 µM) se añadieron directamente sobre cada pocillo. Cuando se utilizaron antagonistas nucleotídicos o inhibidores de rutas de señalización, éstos se añadieron a las placas antes de la adición de los agonistas. Tras unas incubaciones a distintos tiempos (desde 10 minutos a 4 horas), a unas placas se les administraron diferentes estímulos genotóxicos, como el cisplatino a una concentración final entre 20 y 50 µg/ml y la camptotecina a 40 µM. En experimentos de exposición a la luz UV, previamente

a este paso, se les retiró el medio a las placas y se añadió medio nuevo libre de agonistas nucleotídicos, exponiendo entonces las células a la radiación UV durante un periodo de 2 minutos ( $36 \text{ mW/cm}^2$ ) en el transiluminador Kodak Gel Logic 200. Este paso previo fue necesario para evitar el efecto dañino del BzATP, ya que el anillo benzofenona absorbe en el UV. Después de los tratamientos, las células se mantuvieron en el incubador hasta el momento del procesamiento a distintos periodos de tiempo. Los experimentos de viabilidad se realizaron 24 h después de la aplicación de los distintos estímulos genotóxicos.

## **2.6. Ensayo de viabilidad celular basado en el metabolismo del MTT.**

Este kit de la casa comercial Sigma-Aldrich permite, con el empleo de un espectrofotómetro, la determinación de la viabilidad celular en función de la actividad mitocondrial de las células vivas.

Este método se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de romper el anillo de tetrazolio del componente clave del kit, el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio (que en disolución es amarillo), liberando cristales insolubles de formazán, de color morado. Estos cristales de formazán pueden ser solubilizados en isopropanol y medidos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Cuanto mayor sea el número de células vivas presentes, mayor cantidad de cristales de formazán se formarán y mayor será la absorbancia de la muestra.

Para este ensayo se emplearon neuronas granulares de cerebelo que habían sido sembradas en placas de 12 pocillos previamente tratadas con poli-L-lisina, como explicamos previamente en el protocolo de cultivos celulares. Tras la incubación de las células con los estímulos tóxicos, se les retiró el medio completamente y se le añadió tampón Locke ( $\text{NaCl}$  140 mM,  $\text{KCl}$  4.7 mM,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  1.2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5.5 mM a pH 7.4) al que se le había añadido solución reconstituída de MTT a una concentración de  $1,2 \mu\text{M}$ , manteniéndose en incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 2-3 horas. Tras este paso se añadió Tampón de solubilización (Triton X-100 al 10%,  $\text{HCl}$  1 N al 10%, isopropanol al 80%) en volumen igual al que teníamos en el pocillo, agitando la placa durante 30-60 minutos, en agitador orbital, hasta que el formazán se solubilizó completamente. Como último paso se rasparon los pocillos para homogeneizar toda la mezcla y se midió la longitud de onda a 570 nm con ayuda de un espectrofotómetro. Como blanco se empleó una solución de MTT reconstituido en ausencia de células y mezclado con el tampón de solubilización. Los datos de absorbancia obtenidos

de las muestras control, que no habían sido sometidas a ningún tratamiento, se ajustaron como referencia al 100% de supervivencia, calculando así, el porcentaje de viabilidad de las células presentes en los pocillos a los que se les habían añadido los diferentes tratamientos.

## **2.7. Análisis estadístico de los datos.**

Los datos obtenidos se presentan, en general, como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los resultados mostrados en este trabajo corresponden a un mínimo de tres experimentos en duplicado realizados en tres cultivos de neuronas granulares diferentes. Las comparaciones entre medias se realizaron con un análisis de la varianza (ANOVA). Los niveles de significación establecidos han sido:  $p < 0.001$ , diferencia extremadamente significativa (\*\*);  $p < 0.01$ , diferencia significativa (\*\*);  $p < 0.05$ , diferencia marginalmente significativa (\*). Los niveles superiores a 0.05 se han tomado como no significativos (ns). Para un análisis posterior a la obtención de un valor de significancia inferior a 0.05, se utilizó el post-test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples, o bien, el test de Dunnet para comparaciones con respecto al control.

## *Resultados*







## 1. NEUROPROTECCIÓN MEDIADA POR LOS RECEPTORES P2Y<sub>13</sub> Y P2X7 FRENTE A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR RADIACIÓN ULTRAVIOLETA Y CAMPTOTECINA EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

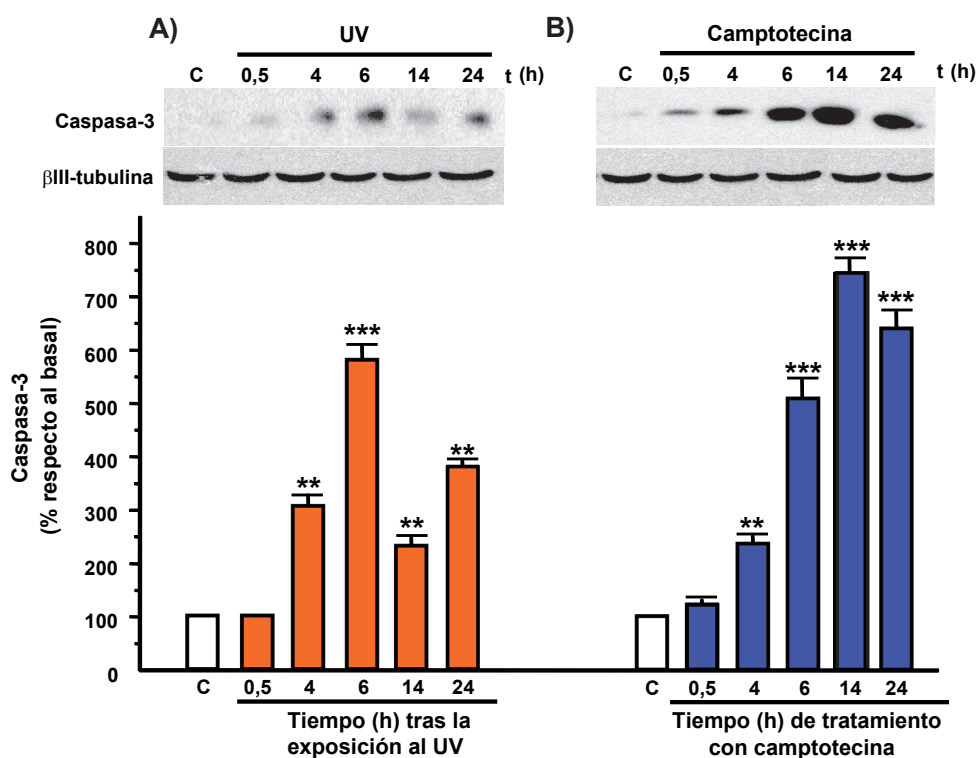
Nuestros estudios se iniciaron en base a la experiencia de trabajos previos del grupo, en los que se había demostrado la importancia de una familia de las MAP quinasas, las proteínas ERK1/2, en la señalización mediada por la activación de los receptores de nucleótidos, P2Y<sub>13</sub> y P2X7, en neuronas granulares de cerebelo (Ortega y cols., 2011). Estos receptores presentaban efectos neuroprotectores y eran capaces de rescatar a las células de la muerte por apoptosis provocada por dosis tóxicas de glutamato. Estos efectos protectores resultaron ser totalmente dependientes de la actividad de las proteínas ERK1/2 en el caso del receptor P2Y<sub>13</sub>, y en cuanto al receptor P2X7, en su efecto protector parecía estar implicada, además de las ERK1/2, otra vía, probablemente dependiente de la proteína GSK3.

A partir de estos resultados, nos interesamos en probar otro tipo de agentes inductores de apoptosis, como los agentes que inducen daño genotóxico, para comprobar si el efecto neuroprotector de los receptores de nucleótidos P2Y<sub>13</sub> y P2X7 se extendía a otros tipos de estímulos dañinos. Además el daño por agentes genotóxicos, que dañan el ADN, desencadena una serie de cambios en las vías de señalización, entre las que destaca la desregulación de las cascadas de las MAP quinasas. Quisimos comprobar cómo se comportaban los receptores de nucleótidos en situaciones en las que estas vías están alteradas. En primer lugar, como primera aproximación del estudio, se utilizó la radiación ultravioleta, ya que se trata de un agente que induce la activación de diversas cascadas de señalización, entre ellas las de las MAP quinasas produciendo un mal funcionamiento celular, alteración de la homeostasis, variación en la expresión génica, desregulación de la expresión de citoquinas y pérdida del control del ciclo celular (Cadet y cols., 2001). Por otro lado, se probó la camptotecina que es un fármaco citotóxico que posee propiedades antiproliferativas y que posee una elevada actividad anticancerígena. Es un inhibidor específico de la topoisomerasa I, e interfiere en los mecanismos de replicación y reparación del DNA, y por tanto se emplea en tratamientos de quimioterapia (Venditto y Simanek, 2010; Kang y cols., 2004). De acuerdo con este planteamiento, en esta primera parte de resultados, nos interesamos en el análisis de la apoptosis inducida por UV y camptotecina en neuronas granulares de cerebelo, en la posible neuroprotección de los receptores

de nucleótidos P2X<sub>7</sub> y P2Y<sub>13</sub> frente a estos estímulos citotóxicos y en el estudio de la señalización de las proteínas ERK1/2 cuando se produce la citotoxicidad y la activación de los receptores nucleotídicos.

### 1.1 Efecto de la radiación UV y la camptotecina en neuronas granulares de cerebelo.

La activación de la caspasa-3 es uno de los mecanismos que desencadena la apoptosis en distintos tipos celulares incluyendo neuronas de corteza, hipocampo y cerebelo (Du y cols., 1997; Nicholson y cols., 1999; Snigdha y cols., 2012). Por ello, se decidió analizar el nivel de activación de la caspasa-3 tras la exposición a la radiación ultravioleta y a la camptotecina en las neuronas granulares de cerebelo, midiendo para ello los niveles del fragmento activo de 17-kD de la caspasa-3 a diferentes tiempos después de la exposición a los agentes genotóxicos, desde los 30 minutos hasta las 24 horas (Figura 28).



**Figura 28. Efecto de la toxicidad inducida por la radiación UV y la camptotecina sobre los niveles de caspasa-3 activa.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se expusieron a la luz UV durante 2 min (A) o se trataron con camptotecina 40  $\mu$ M (B). Los extractos celulares de proteínas se recogieron a diferentes intervalos de tiempo desde los 30 min hasta las 24 h y se analizaron los niveles de fragmento activo de caspasa-3 mediante inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de caspasa-3 normalizados frente a  $\beta$ III-tubulina empleada como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.01$  con respecto a los niveles de células control no tratadas.

Después de la exposición durante 2 minutos a la luz ultravioleta, se puede observar en la Figura 28, que el fragmento activo de caspasa-3 va aumentando progresivamente con el tiempo hasta alcanzar un máximo a las 6 horas en las neuronas granulares. La radiación UV parecía ser un estímulo más potente que la camptotecina, puesto que se requirieron tiempos más largos de tratamiento con la camptotecina para llegar al máximo aumento en los niveles de caspasa-3, que se alcanzó a las 14 horas a una concentración de 40  $\mu\text{M}$ , si bien los niveles del fragmento activo fueron de mayor magnitud que los obtenidos con ultravioleta.

## **1.2 Papel protector de los receptores de nucleótidos P2Y<sub>13</sub> y P2X7 frente a la apoptosis inducida por radiación UV y camptotecina.**

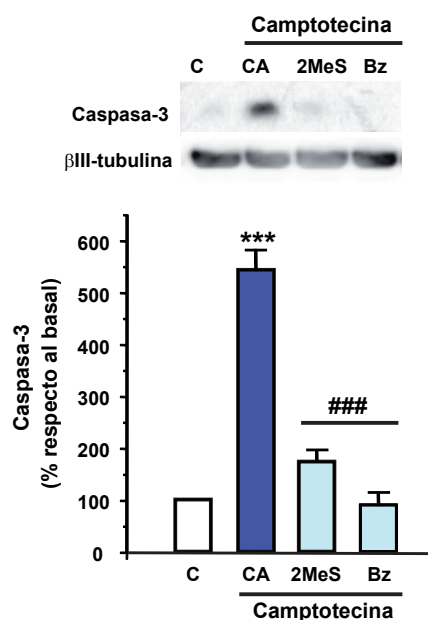
Una vez conocido el tiempo de máxima aparición del fragmento activo de la caspasa-3 en las neuronas granulares tras los diferentes estímulos genotóxicos, el siguiente paso fue estudiar el efecto de la activación de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7 frente a la radiación ultravioleta y a la camptotecina. Acorde con lo descrito en trabajos anteriores en nuestro grupo, se empleó el agonista 2MeSADP (2-Metil-tio-adenosina-5'-difosfato) a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  para la activación de los receptores nucleotídicos P2Y<sub>13</sub> expresados en neuronas granulares de cerebelo (Ortega y cols., 2011), y el agonista BzATP (3'-O-(4-benzoil) benzoil adenosina-5'-trifosfato) a una concentración de 300  $\mu\text{M}$  para la activación selectiva del receptor P2X7 (Ortega y cols., 2009).

Se analizaron los niveles de caspasa-3 tras la estimulación con camptotecina, puesto que era un agente citotóxico más potente que la radiación ultravioleta. Para ello, se realizaron incubaciones de 2 horas con los agonistas nucleotídicos, previas al tratamiento con camptotecina. El resultado fue una disminución muy significativa en los niveles de caspasa-3 en las células pretratadas con el 2MeSADP y el BzATP, con respecto a las células que sólo habían sido estimuladas con camptotecina, como se puede observar en la Figura 29.

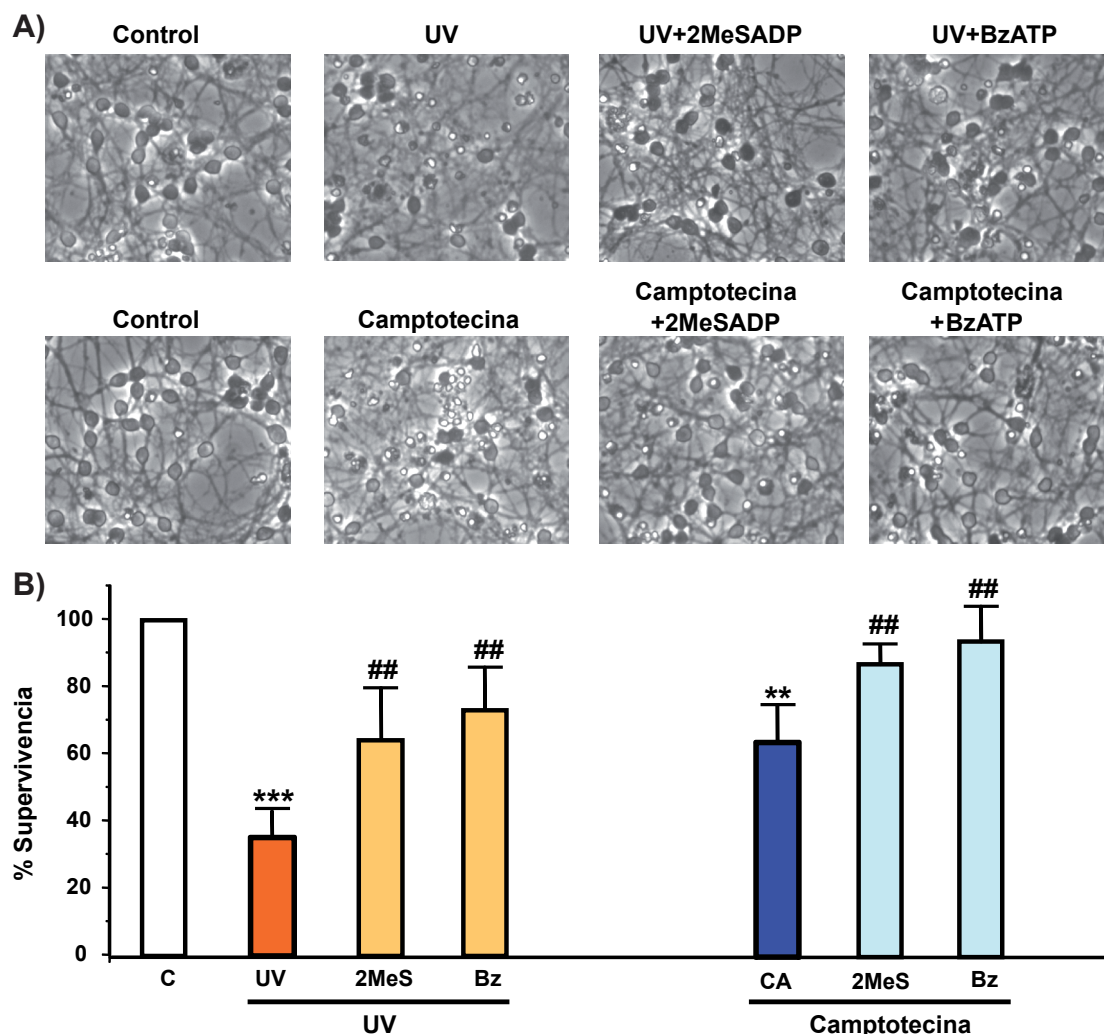
Para confirmar el efecto neuroprotector de los agonistas nucleotídicos en las neuronas granulares frente a la radiación ultravioleta y la camptotecina, se realizaron ensayos de viabilidad celular. Para los dos tipos de tratamiento, los resultados obtenidos mostraron un patrón de muerte que coincidía con la inducción de la apoptosis, que se había visto anteriormente al cuantificar el aumento en los niveles de caspasa-3. En las micrografías de la Figura 30, en las neuronas expuestas a la radiación UV y a la camptotecina, se observa la

condensación de los núcleos, quedando adheridos a la placa, pérdida del contorno celular, y desintegración de las fibras. Los niveles de supervivencia después de 24 horas de exposición a la luz UV siempre fueron menores que los obtenidos con camptotecina, de un 40% y 60%, respectivamente, lo que es indicativo de que la exposición a la luz UV siempre resulta un estímulo tóxico más potente, y que coincide con que el pico de caspasa-3 también se produzca antes en el tiempo. Es posible que la camptotecina necesite un mayor tiempo de exposición y/o concentración en las neuronas granulares *in vitro* para inducir la muerte celular.

Cuando se realizó un tratamiento previo de 2 horas con los agonistas nucleotídicos, 2MeSADP y BzATP, el porcentaje de supervivencia aumentó para ambos tipos de estímulos genotóxicos hasta un 80-90%, siendo más apreciable en las células tratadas con BzATP (Figura 30).



**Figura 29. Efecto de los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y BzATP frente a la toxicidad inducida por camptotecina sobre los niveles de caspasa-3 activa.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se estimularon con 2MeSADP 1  $\mu$ M y BzATP 300  $\mu$ M durante 2 h antes de añadir camptotecina 40  $\mu$ M. Los extractos celulares se recogieron 6 h después del estímulo citotóxico y se analizaron los niveles de fragmento activo de caspasa-3 mediante inmunotransferencia. El histograma muestra los valores densitométricos de caspasa-3 normalizada frente a  $\beta$ III-tubulina, empleada como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células tratadas con camptotecina.



**Figura 30. Efecto neuroprotector del 2MeSADP y del BzATP frente a la toxicidad inducida por radiación UV y camptotecina.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se trataron con luz UV durante 2 min y con camptotecina 40  $\mu$ M. Previamente al estímulo citotóxico, las neuronas granulares fueron estimuladas con 2MeSADP 1  $\mu$ M y BzATP 300  $\mu$ M durante 2 h. En la parte superior de la figura se muestran micrografías de contraste de fases de neuronas sometidas a los distintos tratamientos (A). La viabilidad celular se evaluó 24 h después por medio del ensayo del MTT (B). \*\*\* $p$ <0.001 y \*\* $p$ <0.01 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ## $p$ <0.01 con respecto a los niveles de células tratadas con luz UV o con camptotecina.

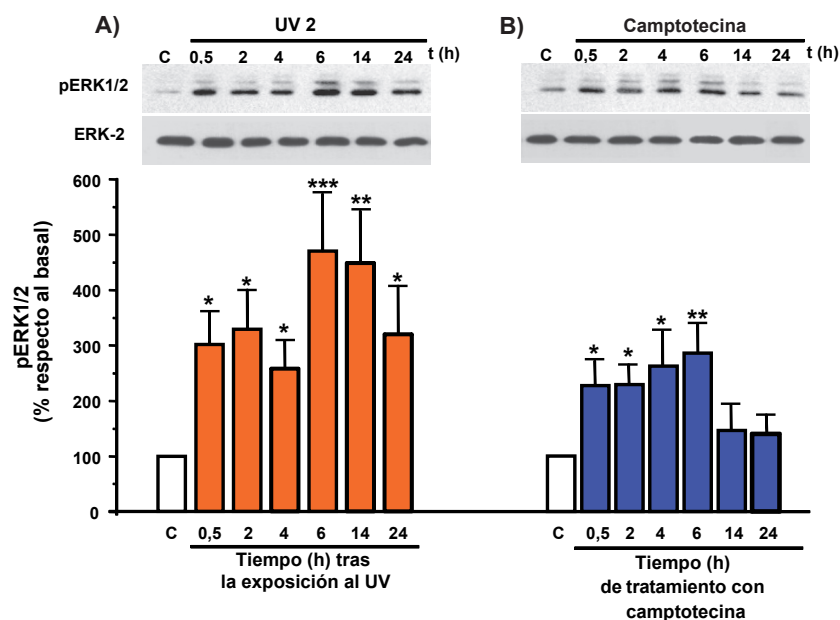
### 1.3 Activación sostenida de las proteínas ERK1/2-MAP quinasas tras la exposición a la radiación UV y camptotecina. Efecto de los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y BzATP.

Para investigar el mecanismo de acción mediante el cual los agonistas nucleotídicos están mediando la neuroprotección frente a la radiación UV y a la camptotecina, analizamos la señalización que era activada en las neuronas granulares durante la estimulación con dichos estímulos genotóxicos. Entre



las familias de proteínas de señalización que están implicadas en procesos de apoptosis o supervivencia en las células neurales, se encuentran las MAP quinasas, como las ERK1/2, p38-MAPK y JNK. Las mejores candidatas podían ser las ERK1/2, ya que se activan de manera muy intensa por la radiación UV (Vaudry y Stork, 2002; Botia y Basille, 2007; Avruch y Zhang, 1994; Sánchez y Hughes, 1994). Estas evidencias nos llevaron a analizar más a fondo el papel de esta familia de las MAP quinasas en los efectos observados con los estímulos genotóxicos, así como el efecto que los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y BzATP, podrían ejercer sobre dichas cascadas de señalización en estas condiciones y su posible participación en los efectos neuroprotectores.

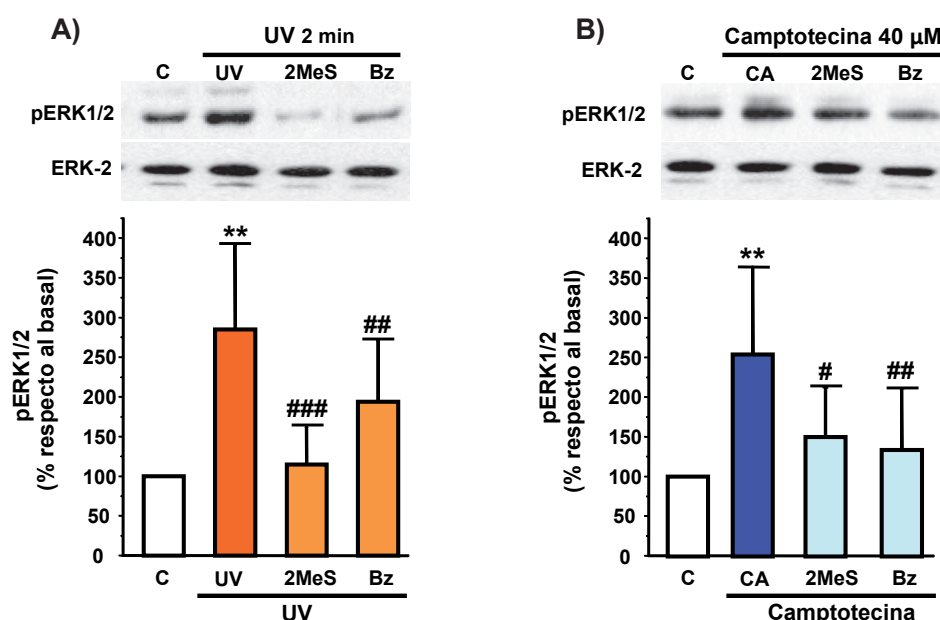
El nivel de la activación de las proteínas ERK1/2 se analizó midiendo el nivel de fosforilación de estas proteínas en los residuos de tirosina, mediante el empleo de anticuerpos específicos como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Como se muestra en la Figura 31, tanto la exposición a la radiación UV como el tratamiento con camptotecina, produjeron un aumento progresivo y mantenido en el tiempo de los niveles de las ERK1/2 fosforiladas, que alcanzaba su nivel máximo a las 6 horas. A partir de estos resultados, quedó establecido el tiempo de 6 horas como óptimo para obtener un grado máximo o significativo en la fosforilación de las ERK1/2.



**Figura 31. Efecto de la exposición a la luz UV y la camptotecina sobre la fosforilación de las ERK1/2.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se trataron con luz UV durante 2 min (A) y con camptotecina 40  $\mu$ M (B). Los extractos celulares fueron recogidos a diferentes intervalos de tiempo desde los 30 min hasta las 24 h analizándose mediante inmunotransferencia los niveles fosforilados de ERK1/2. Los histogramas muestran los valores densitométricos de la fosfoproteína ERK1/2 normalizados frente a ERK-2 total. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  con respecto a los niveles de células control no tratadas.



A continuación se analizó cuál era el efecto de la activación de los receptores de nucleótidos, P2Y<sub>13</sub> y P2X7, sobre la activación mantenida de las ERK1/2 tras la exposición de las neuronas granulares a la radiación UV y la camptotecina. De igual manera que se había realizado en los experimentos de viabilidad celular, las células fueron preincubadas con los agonistas específicos 2MeSADP (1  $\mu$ M) y BzATP (300  $\mu$ M) durante 2 horas, previamente a los tratamientos citotóxicos. Como se puede observar en la Figura 32, la preincubación con los agonistas nucleotídicos redujo la fosforilación de las proteínas ERK1/2, disminuyendo los niveles de fosforilación de manera significativa a las 6 horas de la exposición a la luz UV y la camptotecina. Estos resultados son indicativos de que los nucleótidos son capaces de reestablecer los mecanismos habituales de homeostasis de las cascadas de las MAP quinasas, y que estos efectos deben contribuir a la protección que ejercen frente a la muerte inducida por estos estímulos tóxicos.



**Figura 32. Efecto de los agonistas nucleotídicos 2MeSADP y BzATP sobre la fosforilación de las ERK1/2 inducida por los estímulos genotóxicos.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se trataron luz UV durante 2 min **(A)** y con camptotecina 40  $\mu$ M **(B)**. Previamente al estímulo citotóxico, las neuronas granulares fueron estimuladas con 2MeSADP 1  $\mu$ M y BzATP 300  $\mu$ M durante 2 h. Los extractos celulares fueron recogidos 6 h tras la estimulación citotóxica analizándose mediante inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de la fosfoproteína ERK1/2 normalizados frente a ERK-2 total. \*\* $p < 0.01$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$  y # $p < 0.5$  con respecto a los niveles de células tratadas con luz UV o con camptotecina.

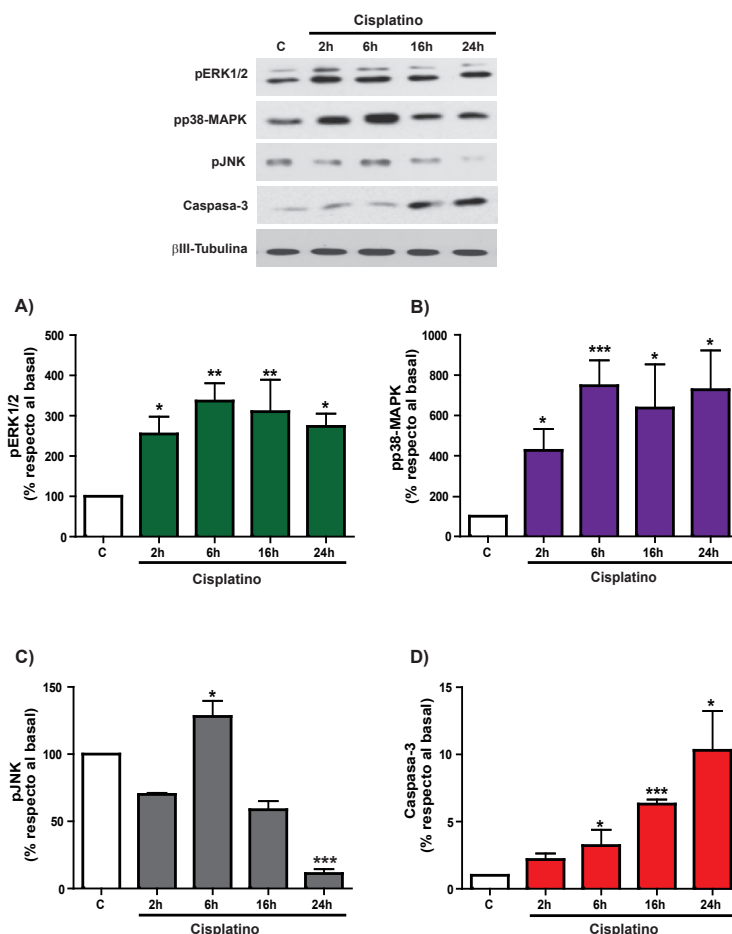
Es necesario hacer constar que los tratamientos con la luz UV y la camptotecina llevaba implícitas una serie de limitaciones, que afectaban a la reproducibilidad de los resultados. En primer lugar, existía una gran

variabilidad en los efectos de la luz UV sobre los diferentes cultivos. Asimismo, la camptotecina era un producto de escasa estabilidad y solubilidad (Wall y cols., 1993), lo que no aseguraba una concentración constante en el medio celular en los diferentes experimentos. Por este motivo, se decidió utilizar otro tipo de droga para inducir estrés genotóxico que produjera los mismos efectos, como era el cis-diamino-dicloroplatino o cisplatino, usada habitualmente en tratamientos de quimioterapia de diferentes tipos de tumores. (Prestayko y col., 1979; Rosenberg y col., 1999; O'Dwyer y col., 2000).

## 2. REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA FOSFATASA DE ESPECIFICIDAD DUAL DUSP2, POR EL RECEPTOR NUCLEOTÍDICO P2Y<sub>13</sub> EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

### 2.1 Efecto de la droga citotóxica cisplatino sobre la señalización de las proteínas MAP quinasas en neuronas granulares.

Para el estudio de la señalización de las proteínas MAP quinasas, las neuronas granulares se trataron con cisplatino a una concentración de 20 µg/ml y los lisados celulares se recogieron a diferentes tiempos tras la adición de la droga (Figura 33).



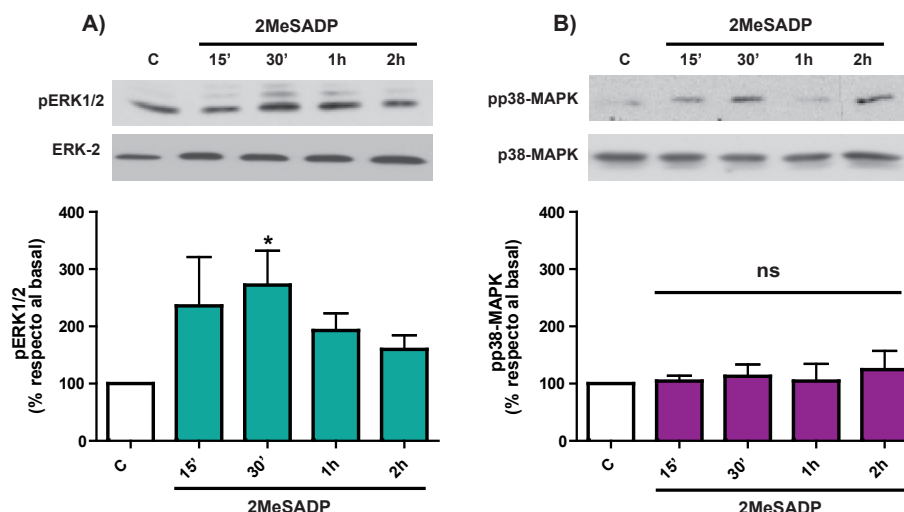
**Figura 33. Efecto del cisplatino en la fosforilación de las proteínas ERK1/2, p38-MAPK y JNK, y en la activación de la caspasa-3.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se trataron con cisplatino 20 µg/ml. Los extractos celulares de proteínas se recogieron en diferentes intervalos de tiempo y se analizaron por inmunotransferencia los niveles de fosforilación de ERK1/2 (A), de p38-MAPK (B), y de JNK (C), además de la presencia de niveles detectables del fragmento activo de 17 kDa de caspasa-3 (D). Los histogramas muestran los valores densitométricos de las fosfoproteínas ERK1/2, p38-MAPK, JNK y de la caspasa-3, normalizados frente a βIII-tubulina empleada como control de carga. \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 y \*p<0.05 con respecto a los niveles de células control no tratadas.

A continuación se midieron las formas fosforiladas en los residuos de tirosina y treonina de las proteínas ERK1/2, p38-MAPK y JNK. Como se muestra en la Figura 33, la exposición a cisplatino causaba una fosforilación mantenida en el tiempo, tanto en las proteínas ERK1/2 como en la p38-MAPK, aunque los niveles en esta última MAP quinasa doblaron a los observados para las ERK1/2. En cuanto a la JNK, su fosforilación apenas se vio afectada tras el tratamiento con cisplatino.

Además, de igual manera que se había obtenido con la luz UV y la camptotecina, la exposición al cisplatino también producía la acumulación progresiva del fragmento activo de caspasa-3 a lo largo del tiempo, estando el incremento máximo alrededor de las 14 - 16 horas después de la adición (Figura 33). Estos resultados indican que el cisplatino también induce la muerte celular de tipo apoptótico dependiente de caspasa-3, como ya se había descrito previamente (McWhinney y cols., 2009).

## **2.2 Efecto del agonista nucleotídico del receptor P2Y<sub>13</sub>, 2MeSADP, sobre la activación sostenida de las proteínas ERK1/2 y p38-MAPK inducida por cisplatino.**

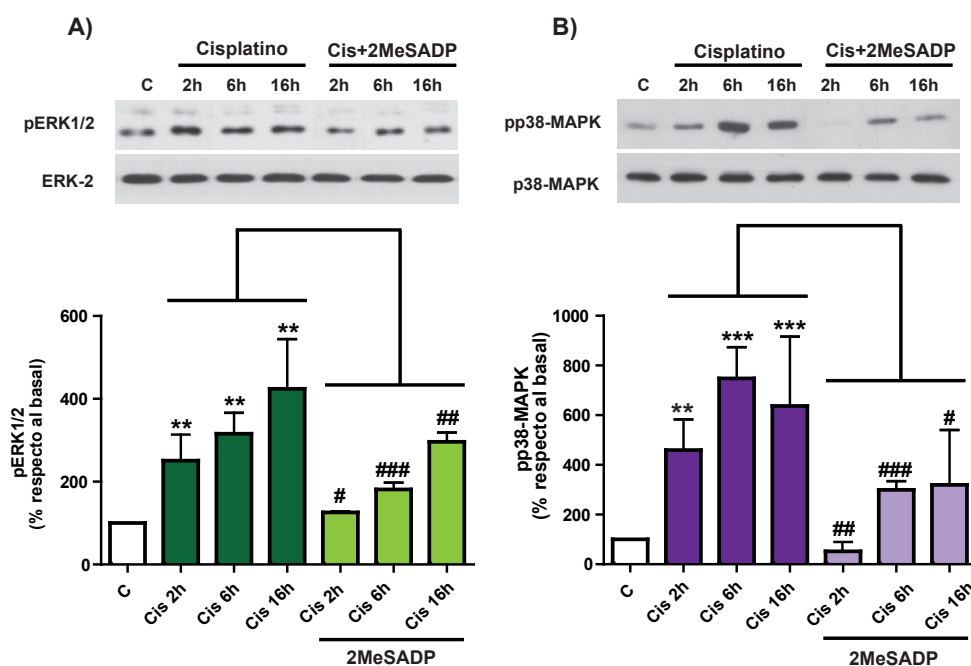
En primer lugar analizamos el efecto de la activación del receptor P2Y<sub>13</sub> con respecto a la sobreactivación en los distintos tipos de MAP quinasas que se observaba tras el tratamiento con cisplatino. En trabajos anteriores ya habíamos descrito que el receptor P2Y<sub>13</sub> estaba acoplado a la fosforilación y activación de las proteínas ERK1/2 a través de un mecanismo dependiente de la PI3K (Ortega y cols., 2011). En aquellos trabajos se habían realizado los experimentos de estimulación con el 2MeSADP en un medio salino (tampón Locke), después de retirar los factores de crecimiento del medio de incubación, lo cual era necesario para bajar los niveles basales de las ERK1/2, normalmente elevados cuando las neuronas granulares se encuentran en el medio completo de cultivo en presencia del cóctel de factores de crecimiento. Pudimos comprobar que, en estas condiciones, el 2MeSADP era también capaz de inducir incrementos en la fosforilación de las proteínas ERK1/2 por encima de los niveles basales, y además de manera transitoria, alcanzando un pico máximo a los 30 minutos, y volviendo prácticamente al estado basal tras las 2 horas de estimulación (Figura 34A). En cambio, el receptor P2Y<sub>13</sub> no parecía estar acoplado a la activación de la p38-MAPK, puesto que no se observó ningún cambio significativo por encima de los niveles basales al estimular con el 2MeSADP (Figura 34B).



**Figura 34. Función tiempo de la fosforilación de ERK1/2 y p38-MAPK inducida por el 2MeSADP.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron estimuladas con 2MeSADP 1  $\mu$ M obteniéndose las muestras tras 15 min, 30 min, 1 y 2 h de estimulación y analizándose mediante inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de las proteínas fosforiladas de ERK1/2 (**A**) y p38-MAPK (**B**) normalizados frente a ERK-2 y p38-MAPK totales, respectivamente. \* $p < 0.05$  y ns (no significativo) con respecto a los niveles de células control no estimuladas.

Una vez comprobado qué tipo de cascadas de MAP quinasas se estaban activando con la estimulación del 2MeSADP, analizamos su efecto en condiciones en que estas proteínas se encuentran desreguladas, como ocurre tras el tratamiento con cisplatino. La preincubación con el agonista nucleotídico 2MeSADP 2 horas antes de la exposición al cisplatino produjo una reducción considerable en los niveles de fosforilación mantenida, tanto de las proteínas ERK1/2, como de la p38-MAPK, que era de la misma magnitud e igualmente reproducible a los diferentes tiempos ensayados tras el tratamiento con cisplatino (Figura 35). Cabe resaltar que el efecto de desfosforilación provocado por el agonista 2MeSADP era mucho más potente y significativo sobre la proteína p38-MAPK, que se traducía en una disminución en torno al 50-60%, mientras que su efecto sobre las ERK1/2 era tan solo de un 30-40%.

Por otro lado, había que tener en cuenta que el agonista nucleotídico 2MeSADP podría estar activando, tanto al receptor  $P2Y_1$  como al receptor  $P2Y_{13}$ , puesto que ambos se expresan en neuronas granulares de cerebelo (Hervas y cols., 2003; Leon y cols., 2006; Ortega y cols., 2011). Para confirmar que el receptor implicado era el receptor  $P2Y_{13}$ , utilizó el antagonista específico MRS-2211. Como se muestra en la Figura 36, la desfosforilación de las proteínas ERK1/2 y p38-MAPK mediada por el 2MeSADP se inhibió completamente con el pretratamiento con MRS-2211, lo que confirma que el receptor responsable de la desfosforilación de las proteínas ERK1/2 y p38-MAPK era un receptor  $P2Y_{13}$ .

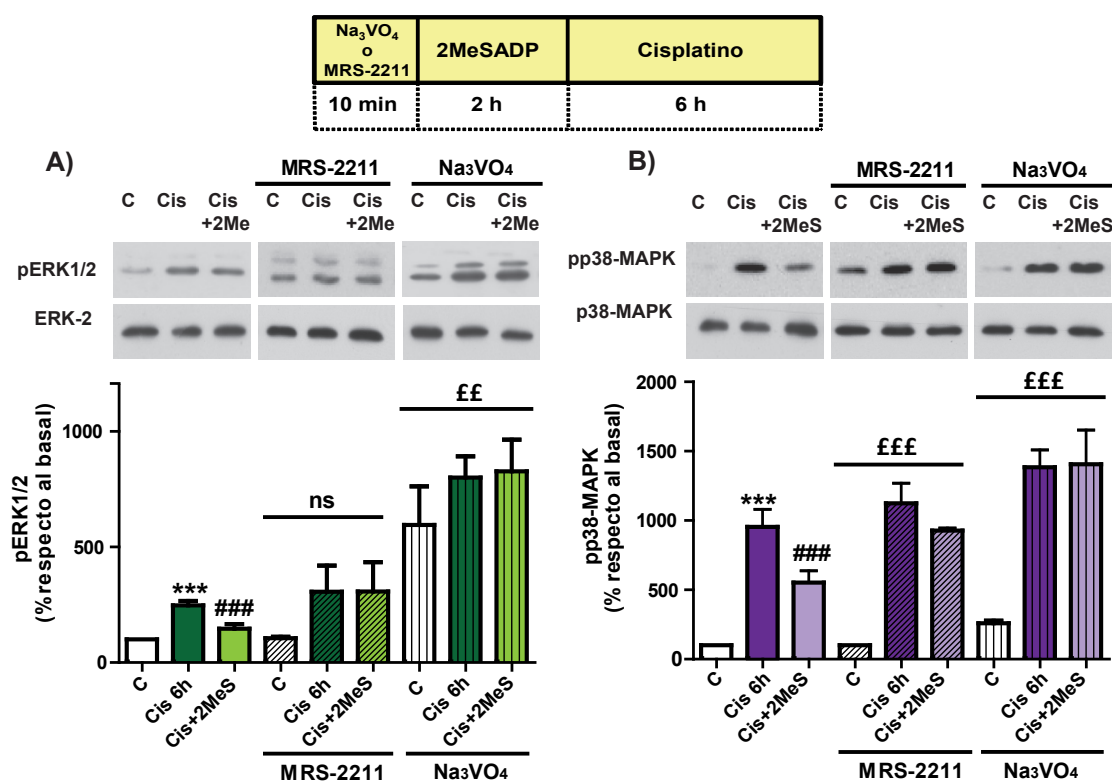


**Figura 35. Efecto del 2MeSADP sobre la fosforilación mantenida de ERK1/2 y p38-MAPK inducida por el tratamiento con cisplatino.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron estimuladas con 2MeS 1  $\mu$ M durante 2 h antes de añadir el cisplatino 20  $\mu$ g/ml. Los extractos fueron recogidos a diferentes tiempos, desde las 2 hasta las 16 h, y analizándose por inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de las fosfoproteínas ERK1/2 **(A)** y p38-MAPK **(B)** normalizadas frente a ERK-2 y p38-MAPK totales, respectivamente. \*\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.01$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas; ### $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  con respecto a los niveles de las células que han sido tratadas con cisplatino.

Los resultados obtenidos anteriormente indican que en el mecanismo de acción del receptor P2Y<sub>13</sub> podrían estar involucradas proteínas fosfatasa, que mantendrían la homeostasis de la señalización de las MAP quinasas. Cuando se probó un inhibidor general de proteínas tirosina fosfatasa, como el ortovanadato (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), éste provocó un incremento significativo en los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2 y p38-MAPK, tanto basales como en condiciones de exposición al cisplatino. Además, para ambos tipos de MAP quinasas, el efecto de desfosforilación inducido por el agonista 2MeSADP fue totalmente inhibido por la acción del ortovanadato (Figura 36).

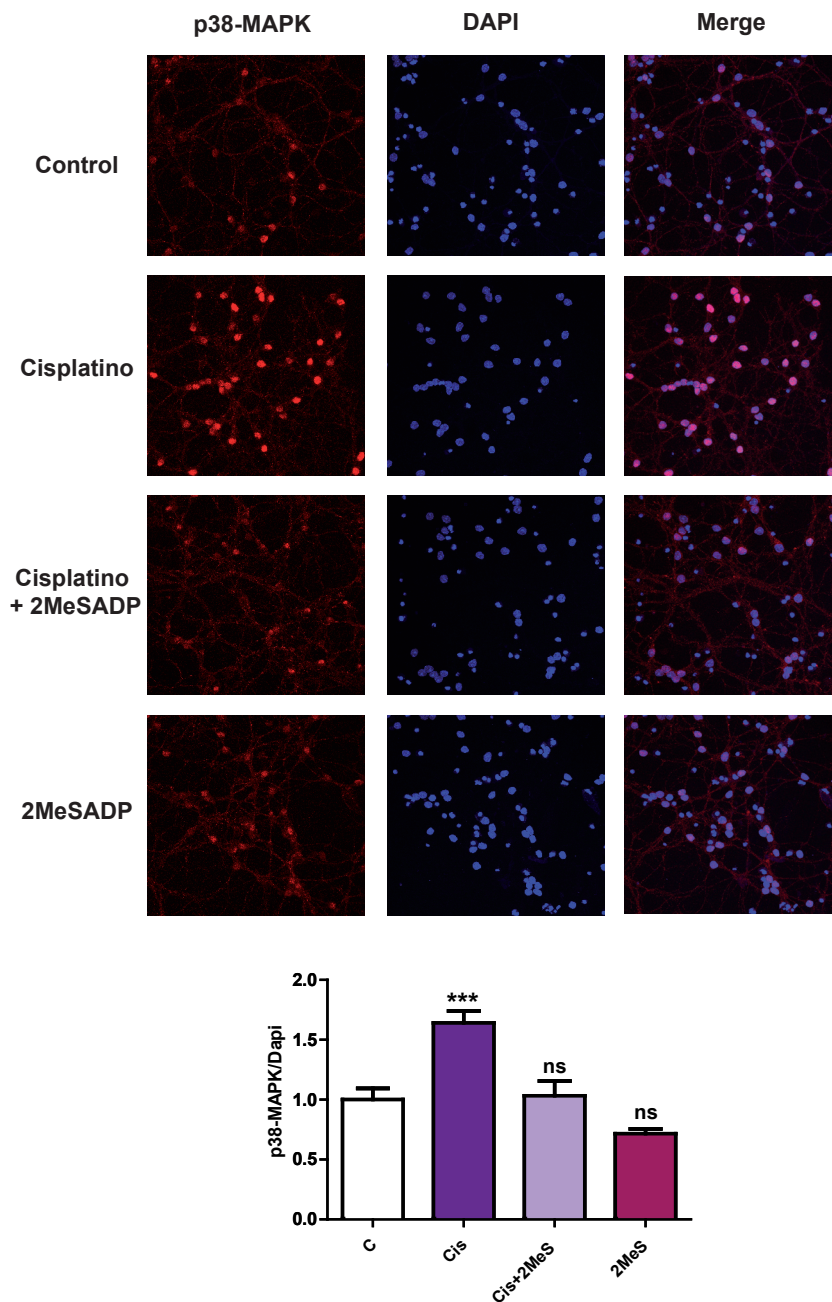
Teniendo en cuenta que los niveles de activación de la proteína p38-MAPK en respuesta a cisplatino siempre fueron mayores que las ERK1/2, se analizó la distribución subcelular de la p38-MAPK fosforilada mediante inmunocitoquímica, puesto que existen numerosas evidencias de su acumulación nuclear tras la exposición a estímulos tóxicos (Herlaar y Brown, 1999; Lee y cols., 2000; Wood y cols., 2009). De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de

western-blot, los niveles basales de la p38-MAPK fosforilada en células control y en células estimuladas con 2MeSADP eran muy bajos. Se observó que el marcaje para la proteína pp38-MAPK estaba repartido de manera uniforme por todo el núcleo y el citoplasma celular. En cambio, tras 4 horas de tratamiento con cisplatino, se observó un marcaje muy intenso en el núcleo que co-localizaba perfectamente con la sonda nuclear DAPI en la mayoría de las células. Como era de esperar, cuando se pretrataron a las células 2 horas con 2MeSADP antes de añadir el cisplatino, se revertió la acumulación nuclear de la p38-MAPK fosforilada inducida por la droga genotóxica y los niveles fosforilados de de p38-MAPK volvieron a ser prácticamente como los basales (Figura 37).



**Figura 36. Efecto del antagonista del receptor  $P2Y_{13}$  y del inhibidor de tirosina-fosfatasa sobre la fosforilación de las pERK1/2 y p38-MAPK inducida por cisplatino.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas durante 10 min con MRS-2211 10  $\mu$ M o Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 250  $\mu$ M. Seguidamente las células fueron estimuladas con 2MeSADP 1  $\mu$ M durante 2 h y finalmente se añadió el cisplatino 20  $\mu$ g/ml. Las muestras se recogieron 6 h después y fueron analizadas por inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de las fosfoproteínas ERK1/2 (A) y p38-MAPK (B), normalizadas frente a ERK-2 y p38-MAPK totales, respectivamente. \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas; ### $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células que han sido tratadas con cisplatino. £££ $p < 0.001$ , ££ $p < 0.01$  y ns (no significativo) cuando se compararon entre sí el tratamiento con MRS-2211 o Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> con respecto a células que no habían sido tratadas con dichos compuestos.

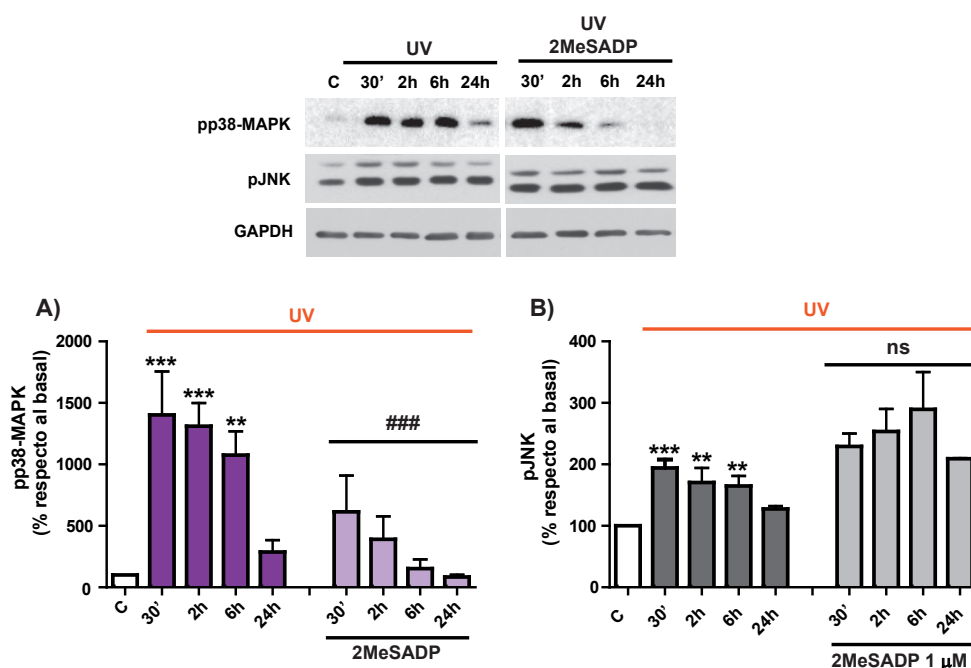




**Figura 37. Translocación nuclear de la proteína p38-MAPK fosforilada (pp38-MAPK) en neuronas granulares expuestas a cisplatino. Efecto del tratamiento con 2MeSADP.** Las neuronas granulares cultivadas sobre cubreobjetos se estimularon durante 2 h en presencia y ausencia de 2MeSADP 1mM, y posteriormente se añadió 20 mg/ml de cisplatino. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% a las 4 h y se realizó la inmunocitoquímica, según se describe en Materiales y Métodos. En las imágenes obtenidas por microscopía confocal se muestra el marcaje en rojo correspondiente a pp38-MAPK, y en azul correspondiente al marcaje de los núcleos con DAPI, y la co-localización de ambos marcajes se observa en las imágenes de la derecha (merge). El histograma muestra el ratio de la intensidad del marcaje de pp38-MAPK frente al de DAPI, y normalizado respecto a la situación control. La cuantificación de la intensidad del marcaje de pp38-MAPK y DAPI se realizó mediante el software LAS AF Lite de Leica, y la relación entre ambos marcajes se realizó en cada campo. Se cuantificaron un mínimo de 7 campos por condición, repetido en 3 cultivos diferentes. \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas, ns (no significativo) con respecto a los niveles de células tratadas con cisplatino.

### 2.3 Efecto del 2MeSADP sobre la activación sostenida de las proteínas MAP quinasas inducida por la radiación UV.

Como se ha observado en el apartado anterior, el efecto del 2MeSADP era mucho más potente oponiéndose a la sobreactivación de la proteína p38-MAPK que sobre las ERK1/2. Por ello, se volvió al tratamiento con radiación UV para comprobar si éste era un mecanismo de acción común para el receptor P2Y<sub>13</sub> frente a distintos estímulos genotóxicos. De igual manera a lo observado con el cisplatino, la exposición de las neuronas granulares a la luz UV producía un incremento significativo y mantenido en el tiempo en la fosforilación de la p38-MAPK, si bien el máximo se alcanzaba a tiempos más cortos, entre 30 minutos y 2 horas, y bajaba a niveles cercanos al basal a las 24 horas. El 2MeSADP fue igual de efectivo disminuyendo la fosforilación de la p38-MAPK a todos los tiempos ensayados (Figura 38A). Con respecto a las JNK, el aumento de la fosforilación fue moderado y apenas se vio afectado por el tratamiento con el 2MeSADP, si bien el efecto del agonista nucleotídico parecía ir en el sentido de aumentar ligeramente su fosforilación, aunque no de manera significativa (Figura 38B).



**Figura 38. Efecto del 2MeSADP sobre la fosforilación de las MAP quinasas p38-MAPK y JNK, inducida por la exposición a la luz UV.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron estimuladas con 2MeSADP 1 μM durante 2 h, y a continuación se expusieron a la luz ultravioleta durante 2 min. Los extractos celulares de proteínas se recogieron a diferentes intervalos de tiempo desde los 30 min hasta las 24 h tras el estímulo genotóxico y se analizaron por inmunotransferencia los niveles de fosforilación de p38-MAPK (A) y de JNK (B). Los histogramas muestran los valores densitométricos de las fosfoproteínas p38-MAPK y JNK normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\*p<0.001 y \*\*p<0.01 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ###p<0.001, ##p<0.01 y ns (no significativo) con respecto a los niveles de células expuestas a la luz UV.

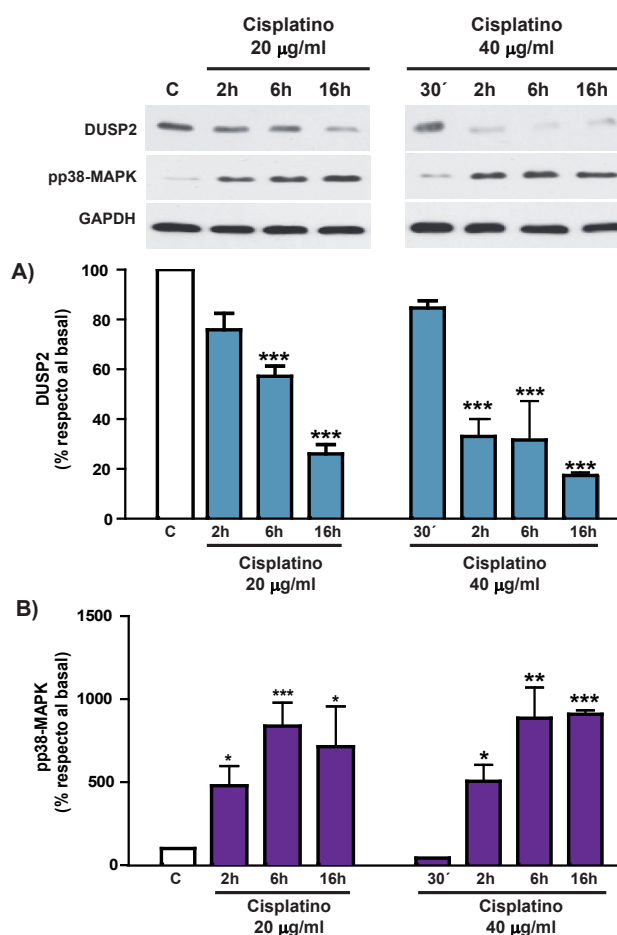
Por lo tanto, estos resultados demuestran que los receptores P2Y<sub>13</sub> pueden operar a través de mecanismos intracelulares similares en respuesta a distintos tipos de estimulación nociva que provocan estrés genotóxico, y en donde la activación de las p38-MAPK parece jugar un papel importante en la respuesta de las neuronas granulares a este tipo de estrés.

#### **2.4 Análisis de la expresión de la proteína fosfatasa DUSP2 en neuronas granulares expuestas al cisplatino y a la radiación UV.**

De acuerdo con los resultados obtenidos con el inhibidor de las tirosina fosfatasas, ortovanadato, la desregulación en la señalización de las MAP quinasas provocada por la exposición al cisplatino y a la radiación UV en las neuronas granulares, puede ser debida a que los mecanismos de control negativo en las cascadas de las MAP quinasas hayan dejado de funcionar correctamente. En este nivel se sitúan las proteínas fosfatasas, y dentro de éstas, la familia de fosfatasas específicas para las MAP quinasas, denominadas MKPs, de las que se sabe que ejercen un papel clave en la terminación de la señal de estas cascadas de señalización. Estas fosfatasas también se denominan DUSPs, puesto que exhiben especificidad dual para los residuos de treonina y tirosina. Dentro del grupo de las DUSPs, la fosfatasa DUSP2 (también denominada PAC-1) parecía ser una buena candidata, puesto que se ha descrito que los sustratos para los que presenta mayor especificidad son precisamente las formas fosforiladas de las ERK1/2 y la p38-MAPK. Además, en trabajos previos del grupo, se habían realizado estudios de expresión génica mediante microarrays, y la DUSP2 aparecía entre los genes que aumentaban su expresión en neuronas granulares estimuladas con 2MeSADP (Ortega, 2009). Por otra parte, se trata de una fosfatasa nuclear de tipo inducible, que podría explicar la desfosforilación de la p38-MAPK observada con el 2MeSADP a nivel del núcleo.

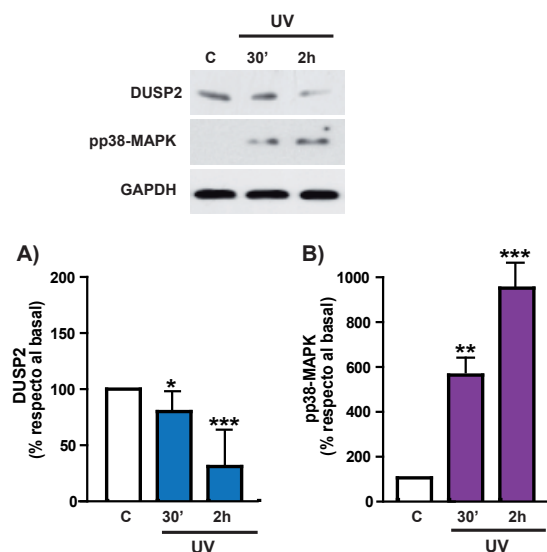
Se estudió entonces cómo variaban los niveles de expresión de la proteína DUSP2 en las neuronas granulares que habían sido expuestas al cisplatino. En la Figura 39 se puede observar la existencia de una relación inversa entre el nivel de expresión de la fosfatasa DUSP2 con respecto a la activación de la p38-MAPK. Es decir, que el aumento de fosforilación mantenido en el tiempo de la p38-MAPK inducido por cisplatino iba en paralelo con la disminución progresiva de la expresión de la proteína DUSP2. Como era de esperar de una fosfatasa inducible, los niveles de expresión basales ya eran bajos en ausencia de estimulación. Además, a diferentes tiempos de exposición al cisplatino, se produce una disminución progresiva en la proteína DUSP2, que llega hasta un

80% o su casi completa desaparición después de 16 horas de la adición de la droga citotóxica. Curiosamente, cuando se aumentaba la concentración de cisplatino a 40  $\mu\text{g/ml}$ , la expresión de la fosfatasa ya ni siquiera era detectable a partir de los 30 minutos. En cambio, el nivel de fosforilación de la p38-MAPK ya había alcanzado la saturación, y no se observaban grandes diferencias entre los niveles alcanzados con las dos concentraciones de cisplatino probadas (Figura 39).



**Figura 39. Relación entre los niveles de expresión de la fosfatasa DUSP2 y los niveles de fosforilación de p38-MAPK tras el tratamiento con cisplatino.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con cisplatino 20  $\mu\text{g/ml}$  y 40  $\mu\text{g/ml}$  a diferentes tiempos desde las 2 hasta las 16 h, analizándose posteriormente por inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de las proteínas DUSP2 (A) pp38-MAPK (B) normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  con respecto a los niveles de células control no tratadas.

Este mismo patrón inverso de la expresión de DUSP2 y de la fosforilación de la p38-MAPK se observó tras la exposición a la radiación UV, si bien a partir de las 2 horas ya se observaba casi la total pérdida de la proteína DUSP2, lo que está de acuerdo con este estímulo tóxico siempre era mucho más potente y causaba un nivel de muerte celular muy elevado (Figura 40).



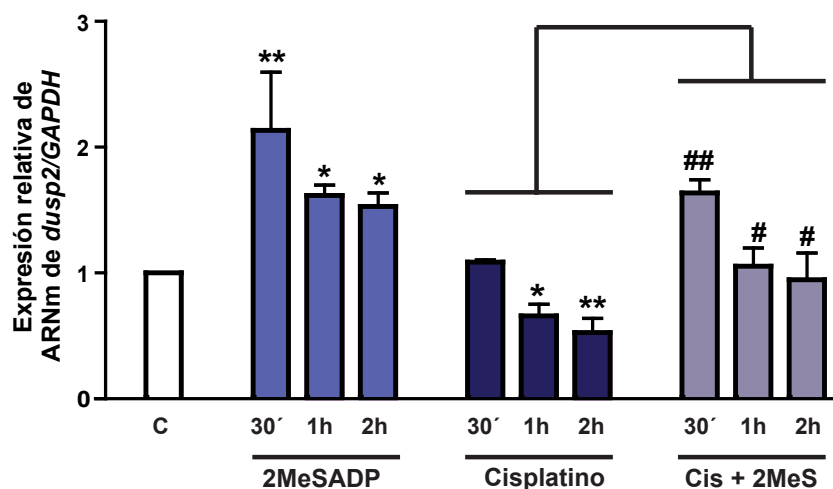
**Figura 40. Relación entre niveles de expresión de la fosfatasa DUSP2 y los niveles de fosforilación de p38-MAPK tras el tratamiento con luz UV.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron expuestas a la luz UV durante 2 min recogiendo las muestras tras 30 min y 2 h, analizándose por inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de las proteínas DUSP2 (A) y pp38-MAPK (B) normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  con respecto a los niveles de células control no expuestas.

Es interesante recalcar que entre la DUSP2 y las proteínas ERK1/2 el grado de correlación no era significativo. Por tanto, estos resultados indicaban que la disminución de la expresión de la proteína fosfatasa DUSP2 podría contribuir o ser la responsable de la desregulación de la señalización de la p38-MAPK en neuronas granulares expuestas a cisplatino y a la luz UV.

## 2.5 Expresión de la proteína fosfatasa DUSP2 mediada por el agonista nucleotídico 2MeSADP.

Los niveles de expresión de la fosfatasa DUSP2 examinaron a nivel de mensajero en neuronas granulares estimuladas con el agonista del receptor P2Y13, 2MeSADP. Como se muestra en la Figura 41, el 2MeSADP 1  $\mu$ M era capaz de inducir un aumento significativo en la expresión del gen *dusp2*, que se observaba a tiempos muy cortos, duplicando sus niveles a partir de 30 minutos, como corresponde a un gen de expresión temprana (IEG), y disminuyendo ligeramente entre 1 y 2 horas. En cambio, en las células que habían sido tratadas con cisplatino, los niveles de expresión de *dusp2* disminuían progresivamente a medida que aumentaba el tiempo de exposición al agente citotóxico, como se había visto anteriormente a nivel de proteína. Como era esperable, si se realizaba una incubación previa de 30 minutos con 2MeSADP 1  $\mu$ M antes de exponer a las

neuronas granulares al cisplatino, se prevenía la caída de los niveles basales de *dusp2* provocados por el estrés genotóxico (Figura 41).

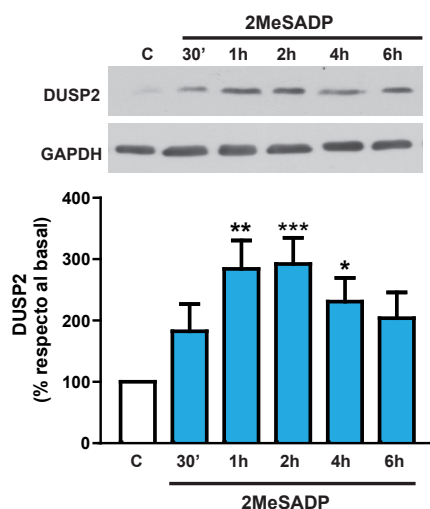


**Figura 41. Variaciones en los niveles de ARNm de *dusp2* en presencia de 2MeSADP y cisplatino.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con 2MeSADP 1  $\mu$ M o con cisplatino 20  $\mu$ g/ml (solo o después de una preincubación de 30 min con 2MeSADP), obteniéndose el ARNm tras 30 min, 1 y 2 h posteriores a la estimulación y analizándose mediante PCR cuantitativa. El histograma muestra los niveles relativos de ARNm de *dusp2*/*GAPDH* normalizados frente al control (C). \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ## $p < 0.01$  y # $p < 0.05$  con respecto a los niveles de células tratadas con cisplatino.

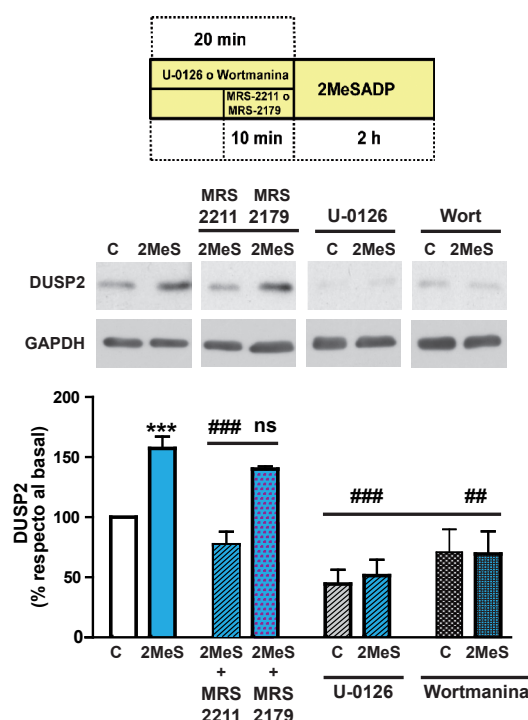
Cuando se analizó la expresión de DUSP2 a nivel de proteína, los datos coincidieron con lo que se había observado a nivel de mensajero, es decir, que la expresión de DUSP2 se veía aumentada en las células que habían sido tratadas con el agonista nucleotídico 2MeSADP 1  $\mu$ M, siendo detectables a partir de los 30 minutos, alcanzando su máximo de expresión entre 1 y 2 horas, y manteniéndose elevados hasta las 4 horas (Figura 42).

De acuerdo con resultados anteriores, el aumento en la expresión de la proteína DUSP2 inducido por 2MeSADP, era un efecto dependiente de la activación de un receptor  $P2Y_{13}$ , puesto que se perdía al tratar a las neuronas granulares con el antagonista del  $P2Y_{13}$ , el MRS-2211, pero no con el antagonista del  $P2Y_1$ , el MRS-2179 (Figura 43). Asimismo dependía de la vía de señalización canónica descrita para el receptor  $P2Y_{13}$  en neuronas granulares (Ortega y cols., 2011), ya que la expresión de DUSP2 se vio comprometida cuando se emplearon inhibidores de distintas vías de señalización como el U-0126, que inhibe las quinasas que fosforilan ERK1/2, y la wortmanina, que inactiva la vía dependiente de PI3K.





**Figura 42. Función tiempo de la expresión de DUSP2 inducida por 2MeSADP.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con 2MeSADP 1  $\mu$ M obteniéndose las muestras tras 30 min, 1, 2, 4 y 6 h posterior a la estimulación y analizándose mediante inmunotransferencia la proteína DUSP2. El histograma muestra la variación respecto al valor basal. Los valores densitométricos de la proteína DUSP2 fueron normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01 y \* $p$ <0.05 con respecto a los niveles de células control no estimuladas.



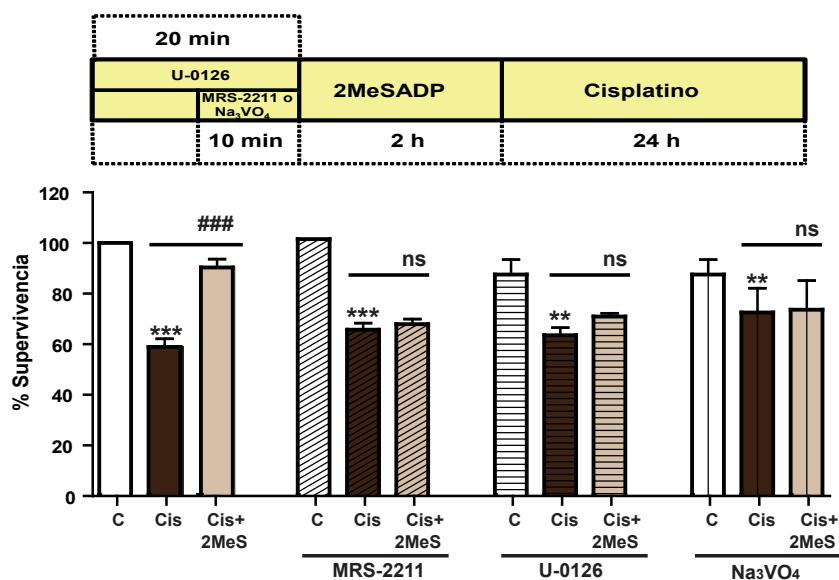
**Figura 43. Efecto de antagonistas de los receptores  $P2Y_{13}$  y  $P2Y_{11}$ , y de distintos inhibidores de proteínas de señalización sobre los niveles de expresión de la proteína DUSP2 inducida por 2MeSADP.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron preincubadas con MRS-2211 10  $\mu$ M o con MRS-2179 10  $\mu$ M, durante 10 min, y con U-0126 10  $\mu$ M o Wortmanina 1  $\mu$ M durante 20 min, y después estimuladas con 2MeSADP 1  $\mu$ M durante 2 h. Los histogramas muestran los valores densitométricos de la proteína DUSP2 normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\* $p$ <0.001 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p$ <0.001 y ## $p$ <0.01 cuando se compararon los tratamientos con MRS-2211, MRS-2179, U-0126 y Wortmanina con respecto a las células que no han sido tratadas con dichos compuestos.



En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con cisplatino podría ser responsable de la inhibición transcripcional del gen *dusp2*, lo cual explicaría la pérdida de expresión de esta fosfatasa, y la desregulación a nivel de la p38-MAPK. En este sentido, la proteína DUSP2 podría ser una diana específica de la activación del receptor P2Y<sub>13</sub> a través de una vía dependiente de PI3K/ERK1/2, que estaría contribuyendo a mantener la homeostasis de esta ruta de MAP quinasas.

## 2.6 Efecto neuroprotector del receptor P2Y<sub>13</sub> frente a la apoptosis inducida por cisplatino y radiación UV.

Como se ha descrito anteriormente en la Figura 33D, la vía apoptótica dependiente de caspasa-3 resultaba activada tras la exposición al cisplatino. Esto se correspondía con unos niveles de muerte celular en torno al 40%, cuando se realizaron los ensayos de viabilidad celular después de 24 horas (Figura 44). Las neuronas granulares que fueron pretratadas con el agonista nucleotídico 2MeSADP 1  $\mu$ M durante un periodo de 2 horas, presentaron un aumento en la tasa de supervivencia de hasta un 90%.



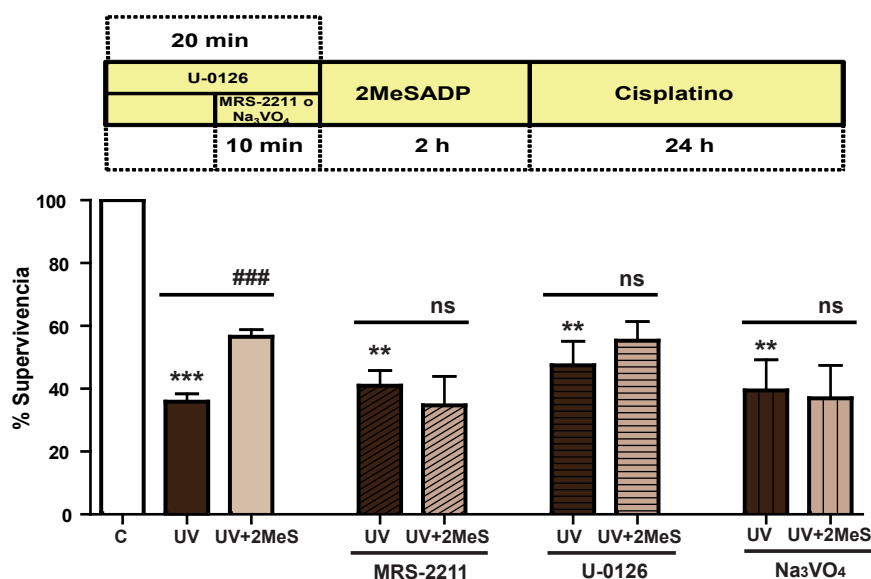
**Figura 44. Efecto neuroprotector del 2MeSADP frente a la toxicidad inducida por cisplatino.**

Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo fueron preincubadas durante 10 min en presencia y ausencia de MRS-2211 10  $\mu$ M y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 250  $\mu$ M y 20 min con U-0126 10  $\mu$ M. A continuación se estimularon con 2MeSADP 1  $\mu$ M durante 2 h. Finalmente, se trataron las células con cisplatino 20  $\mu$ g/ml. La viabilidad celular se evaluó 24 h después por medio del ensayo del MTT. \*\*\*p<0.001 y \*\*p<0.01 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ###p<0.001 y ns (no significativo) con respecto a los niveles de células estimuladas con cisplatino.

Este efecto protector del 2MeSADP era suprimido por completo cuando se realizaba una incubación previa con el antagonista del receptor del  $P2Y_{13}$  MRS-2211, y con el inhibidor de la vía de señalización de las ERK1/2, U-0126 (Figura 44).

Asimismo, cuando se probó el inhibidor de las tirosina fosfatasa, el ortovanadato, los niveles de supervivencia celular disminuyeron y se previno el efecto protector del 2MeSADP frente a la muerte por cisplatino. Se obtuvieron resultados similares tras la exposición a la luz UV (Figura 45), y aunque este tratamiento producía mayores niveles de muerte celular, en torno a un 60%, el 2MeSADP todavía era capaz de aumentar la supervivencia.

En conjunto, todos estos resultados demuestran que el efecto regulador de la activación del receptor nucleotídico  $P2Y_{13}$  sobre la fosfatasa DUSP2 podría contribuir a la neuroprotección inducida por el agonista 2MeSADP frente al estrés genotóxico.



**Figura 45. Efecto neuroprotector del 2MeSADP frente a la toxicidad inducida por luz ultravioleta.**

Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo fueron preincubadas durante 10 min en presencia y ausencia de MRS-2211 10  $\mu$ M o  $Na_3VO_4$  250  $\mu$ M y 20 min con U-0126 10  $\mu$ M. A continuación se estimularon con 2MeSADP 1  $\mu$ M durante 2 h. Finalmente, se expusieron a luz ultravioleta durante 2 min. La viabilidad celular se evaluó 24 h después por medio del ensayo del MTT. \*\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.01$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p < 0.001$  y ns (no significativo) con respecto a los niveles de células tratadas con luz ultravioleta.

### 3. REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA FOSFATASA DE ESPECIFICIDAD DUAL DUSP6, POR EL RECEPTOR NUCLEOTÍDICO P2X7 EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.

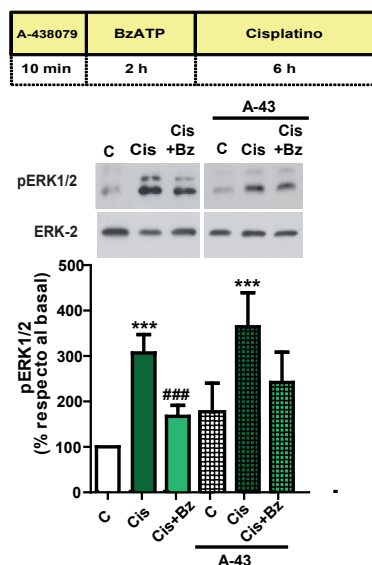
#### 3.1. Efecto del agonista nucleotídico del P2X7, BzATP, sobre la activación sostenida de las proteínas ERK1/2 inducida por cisplatino en neuronas granulares.

En los primeros obtenidos durante la exposición a la luz UV y a la droga citotóxica, camptotecina, ya habíamos observado que el tratamiento con el agonista específico del receptor P2X7, BzATP, también contribuía a la supervivencia celular y al mantenimiento de la señalización de las proteínas ERK1/2 en unos niveles normales, después del aumento alcanzado tras la exposición a estos agentes nocivos. A partir de aquí, quisimos comprobar si, de manera análoga a lo que se había visto con el receptor P2Y<sub>13</sub>, el receptor P2X7 también podría restaurar la homeostasis de las MAP quinasas a través de la regulación de proteínas fosfatasa específicas.

Para continuar en la misma línea de trabajo, estos estudios se realizaron empleando como estímulo de estrés genotóxico, el cisplatino, y se dejaron atrás los tratamientos con luz UV y camptotecina. De hecho, en el caso del BzATP, los experimentos con la luz UV presentaban, además, una dificultad adicional. En trabajos anteriores del grupo ya se sabía que el anillo benzofenona del agonista BzATP era capaz de absorber en el UV (Leon y cols., 2007). Por ese motivo, y basándonos en estas evidencias, después del tratamiento con el BzATP y antes de exponer a la radiación UV, se cambiaba el medio a las células de manera rutinaria, para eliminar en todo lo posible la presencia de este compuesto, y evitar de este modo un efecto dañino adicional sobre las neuronas granulares. No obstante, aunque se guardaban estas precauciones, siempre se obtenía un alto grado de variabilidad, y por ello, se prefirió trabajar en lo sucesivo con el cisplatino, de igual manera que se había hecho con el 2MeSADP.

Como era esperable, el pretratamiento de las neuronas granulares con el agonista BzATP, a una concentración de 300  $\mu$ M con la que se consigue la activación máxima del receptor P2X7, también era capaz de restablecer los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2 hasta prácticamente los niveles basales, que se veían aumentadas tras la exposición al cisplatino durante 6 horas (Figura 46). El efecto del BzATP se comprobó que estaba mediado por un receptor P2X7,

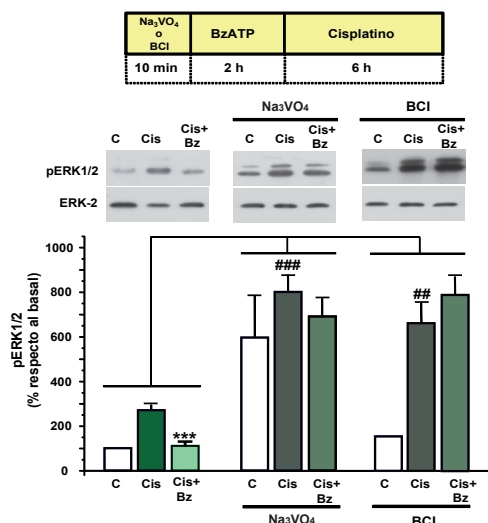
puesto que se perdía después de la incubación con el antagonista específico P2X7, el A-438079.



**Figura 46. Efecto del BzATP en la fosforilación mantenida de las ERK1/2 inducida por el tratamiento con cisplatino.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo se estimularon BzATP 300  $\mu$ M durante 2 horas antes de añadir el cisplatino 20  $\mu$ g/ml. Cuando se probó el antagonista P2X7, A-438079 10  $\mu$ M, éste se añadió 10 min antes que el BzATP. Los extractos celulares se recogieron a las 6 h tras el estímulo citotóxico y se analizaron los niveles fosforilados de ERK1/2 mediante inmunotransferencia. El histograma muestra los valores densitométricos de pERK1/2 normalizados frente a ERK-2 total. \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células tratadas con cisplatino.

Es interesante resaltar, que a diferencia de lo observado con el agonista P2Y<sub>13</sub>, 2MeSADP, el BzATP no modificaba de ninguna manera los niveles de fosforilación de las MAP quinasas asociadas al estrés, como la p38-MAPK las JNK (resultados no mostrados). Estos resultados están indicando que el efecto del BzATP se dirigía de manera específica a la regulación de la duración e intensidad de la señalización de las ERK1/2, de la misma manera que ocurría con la exposición a la luz UV.

En este apartado también se analizó la posible participación de una proteína fosfatasa de especificidad dual para explicar la desfosforilación inducida por el BzATP sobre las proteínas ERK1/2. Para ello, se probaron los efectos de algunos inhibidores de proteínas fosfatasas. En primer lugar se analizó el efecto del inhibidor general de tirosina fosfatasas, ortovanadato. En la Figura 47 se muestra cómo el ortovanadato provoca un aumento significativo en el nivel de fosforilación de las ERK1/2, tanto en células control sin estimular, como en células expuestas al cisplatino. Además, el efecto de desfosforilación por parte del agonista P2X7, BzATP, se perdía completamente por el pretratamiento con este inhibidor.



**Figura 47. Efecto de inhibidores de proteínas tirosina fosfatasas sobre la fosforilación de las pERK1/2 inducidas por cisplatino** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo se preincubaron durante 10 min con  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  250  $\mu\text{M}$  o BCI 4  $\mu\text{M}$ , después se estimularon con BzATP 300  $\mu\text{M}$  durante 2 h, y finalmente se añadió el cisplatino 20  $\mu\text{g/ml}$ . Los extractos celulares se recogieron a las 6 h tras el estímulo citotóxico y se analizaron los niveles de ERK1/2 fosforilados mediante inmunotransferencia. El histograma muestra los valores densitométricos de pERK1/2 normalizada frente a ERK-2 total. \*\*\* $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p < 0.001$  y ## $p < 0.001$  cuando se compararon los resultados de los tratamientos con los tratamientos en presencia y ausencia de los inhibidores de fosfatasas.

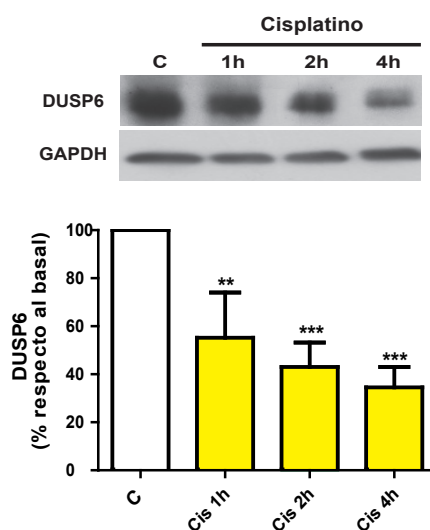
En la búsqueda de inhibidores más selectivos de la fosforilación de las ERK1/2, encontramos el compuesto BCI, que es citado en la bibliografía como selectivo de proteínas fosfatasas de especificidad dual DUSPs, concretamente la DUSP6. Este inhibidor nos pareció adecuado para nuestros estudios, puesto que el efecto del BzATP era específico de la desfosforilación de las proteínas ERK1/2, y la fosfatasa DUSP6, que se encuentra dentro del grupo de las fosfatasas constitutivas que se expresan a nivel basal, es selectiva para este tipo de MAP quinasa y propia de células neurales. Además, en los estudios previos de expresión por microarrays realizados en neuronas granulares estimuladas con BzATP, ya habíamos visto que se aumentaba la expresión del gen *dusp6* (Ortega, 2009). Por ello, como una primera aproximación de la implicación de este tipo de fosfatasas en el efecto del BzATP, se probó el inhibidor específico BCI. Como se puede observar en la Figura 47, el BCI también producía un aumento significativo en los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2, tanto en células en el basal como después del tratamiento con cisplatino. Si bien, los niveles basales de las ERK1/2 no aumentaban tanto como en el caso del ortovanadato, indicando que la señalización de las ERK1/2-MAPK en neuronas granulares estaría regulada por distintos tipos de fosfatasas, entre las que se encontrarían las DUSP6. En cambio, en las células tratadas con BzATP, previamente a la adición del cisplatino, no

se observaba ningún signo de desfosforilación, y por tanto, la fosfatasa DUSP6 podía ser un punto de control específico para el receptor P2X7.

### **3.2. Análisis de la expresión de la proteína fosfatasa DUSP6 en neuronas granulares expuestas al cisplatino.**

A continuación, se quiso profundizar más en la implicación de la fosfatasa DUSP6 como reguladora de la señalización de las proteínas ERK1/2 en las neuronas granulares expuestas al cisplatino. Cuando se estudiaron los niveles de expresión de la proteína DUSP6, se comprobó que la expresión basal de DUSP6 disminuía de manera muy rápida y muy acusada con el tiempo de exposición al cisplatino, de manera que a las 2 horas ya había disminuido más del 50% de la proteína y desaparecía prácticamente a las 6 horas (Figura 48). Esta disminución seguía un patrón inverso con el aumento progresivo en la fosforilación de las proteínas ERK1/2 a distintos tiempos que se había visto anteriormente (Figuras 36 y 46).

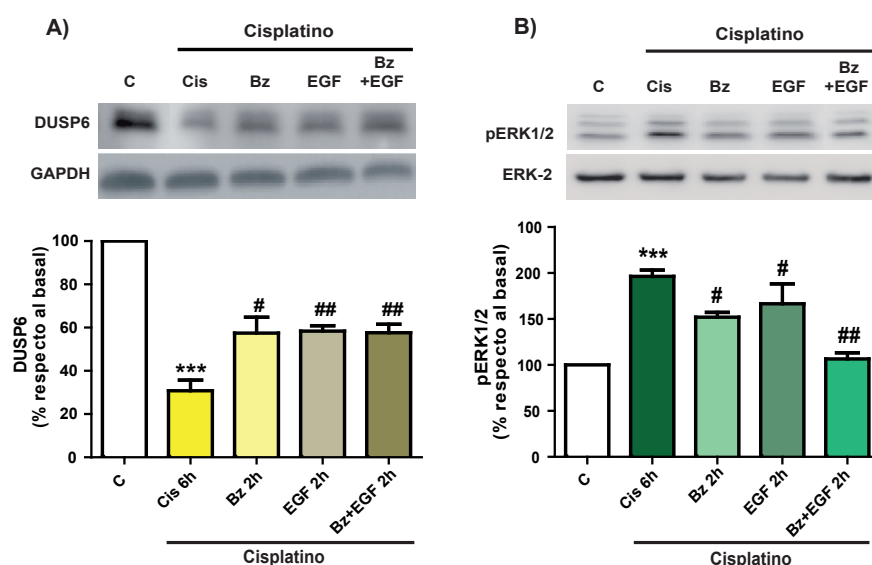
Estos resultados son indicativos de que la desregulación que se produce en la señalización de las ERK1/2 como consecuencia de este tratamiento citotóxico, se puede deber a un fallo en los mecanismos de inactivación de la señal, es decir, a los mecanismos de desfosforilación en los que estarían interviniendo proteínas fosfatasas como la DUSP6.



**Figura 48. Niveles de expresión de la proteína fosfatasa DUSP6 tras el tratamiento con cisplatino.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con cisplatino 20  $\mu\text{g/ml}$  y durante 1, 2 y 4 h analizándose posteriormente por inmunotransferencia. El histograma muestra los valores densitométricos de la proteína DUSP6 normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.01$  con respecto a los niveles de células control no tratadas.

Teniendo en cuenta que el BzATP mostraba su efecto disminuyendo la fosforilación de las ERK1/2, analizamos si era capaz de restaurar los niveles de expresión de DUSP6 que se perdían tras el tratamiento con cisplatino. Además se probó el efecto del factor de crecimiento epidérmico, EGF, como control positivo de la expresión de DUSP6, ya que se ha descrito en la bibliografía que es capaz de inducir la expresión de algunas proteínas fosfatasa de la familia de las DUSPs, entre las que se encuentra incluida la DUSP6 (Sárkozi y cols., 2006). Tomando el tiempo de 6 horas de tratamiento con cisplatino como representativo, analizamos el efecto de la preincubación con BzATP 300  $\mu$ M y EGF 4  $\mu$ M sobre la expresión de DUSP6 y la desfosforilación de las ERK1/2 en paralelo.

Como se puede ver en la Figura 49A, tanto el BzATP como el EGF restauraban parcialmente la expresión de DUSP6, que había disminuido como consecuencia de la exposición al cisplatino. Como ya se había visto anteriormente para el BzATP, el EGF también era capaz de desfosforilar a las proteínas ERK1/2 (Figura 49B). La preincubación simultánea con los dos compuestos tuvo un efecto aditivo sobre la desfosforilación de las ERK1/2, aunque sobre la expresión de la proteína DUSP6, no se veía tan claramente.



**Figura 49. Efecto del BzATP y EGF sobre los niveles de expresión de DUSP6 y fosforilación de las ERK1/2 tras el tratamiento con cisplatino.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron previamente estimuladas con BzATP 300  $\mu$ M y/o EGF 4  $\mu$ M durante 2 h y después tratadas con cisplatino 20  $\mu$ g/ml. Las muestras se recogieron pasadas 6 h tras el estímulo citotóxico, analizándose posteriormente por inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de las proteínas DUSP6 (A) y ERK1/2 (B) y normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\* $p$ <0.001 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ## $p$ <0.01 y # $p$ <0.5 con respecto a los niveles de células tratadas con cisplatino.



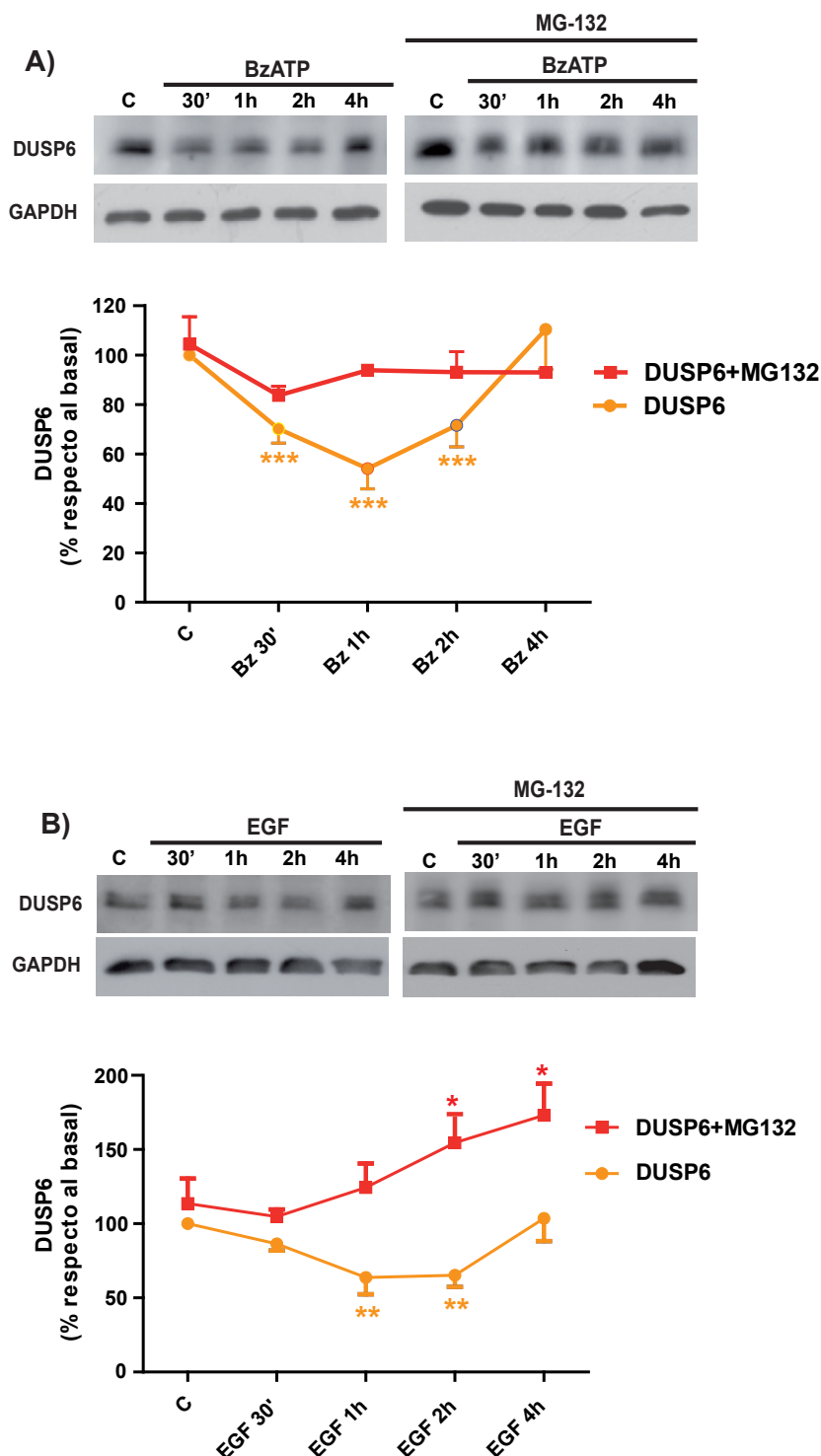
### **3.3. Expresión de la proteína fosfatasa DUSP6 inducida por BzATP y EGF.**

Una vez obtenida la evidencia de que el pretratamiento de las células con BzATP o EGF evitaba la disminución de los niveles de la proteína DUSP6, se quisieron conocer los mecanismos responsables que mantenían la estabilidad de esta fosfatasa. Para ello se analizó el efecto de diferentes tiempos de incubación con el agonista nucleotídico y el factor de crecimiento sobre la expresión de DUSP6 tanto a nivel de proteína como de mensajero.

Teniendo en cuenta que la DUSP6 es una fosfatasa constitutiva, se observó una bajada de expresión de la proteína en los primeros tiempos de estimulación con el BzATP y EGF. Para ambas estimulaciones, los niveles de la proteína DUSP6 decaían hasta un 50% en 1 hora (Figuras 50A y 50B). Pasado este tiempo, se observó un cambio de tendencia, y la expresión de DUSP6 se recuperaba y subía desde las 2 horas hacia las 4 horas. La caída en la expresión de la proteína DUSP6 podría deberse a que la proteína se hubiera degradado. Esto estaría de acuerdo con lo descrito en la bibliografía para algunos tipos de fosfatasas DUSPs, que pueden ser fosforiladas por las mismas MAP quinasas que son sus sustratos, y esta fosforilación constituye una señal para su degradación por el proteasoma. Por ello, realizamos la misma estimulación con BzATP y EGF, pero esta vez, en presencia de un inhibidor de la actividad del proteasoma, el MG-132. Como se observa en las Figuras 50A y 50B, el tratamiento con MG-132 fue capaz de prevenir completamente la caída de la proteína DUSP6. Es interesante destacar que con el BzATP se restablecía la expresión basal de DUSP6, en cambio, con el EGF la expresión de esta fosfatasa seguía aumentando por encima del nivel basal a partir de 1 hora, y el incremento se hacía significativo a las 2 - 4 horas.

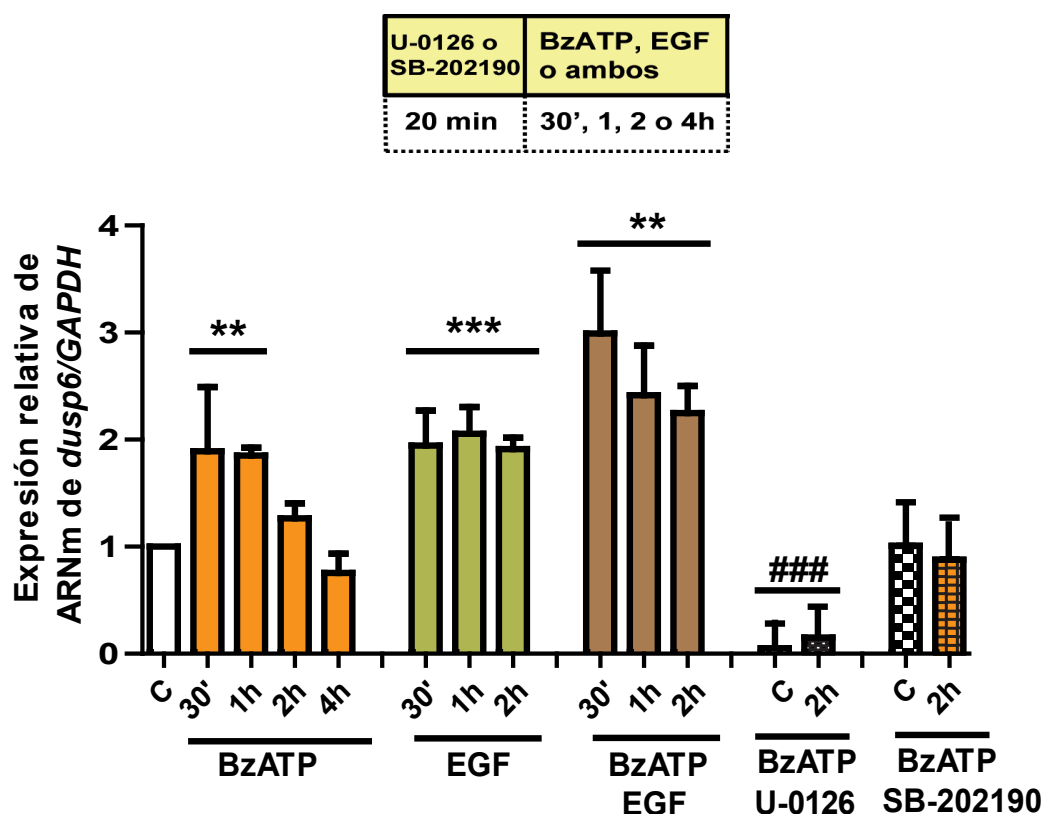
Estos resultados son indicativos de que la activación de la señalización de las ERK1/2 mediada por los agonistas nucleotídicos y los factores de crecimiento, lleva en un primer momento a la regulación en sentido negativo de la expresión basal de la fosfatasa DUSP6, probablemente a través de un mecanismo que implica la fosforilación por las propias ERK1/2 y su degradación por el proteasoma. En una segunda etapa, cuando la señal de las ERK1/2 habría caído, se recuperan los niveles de expresión de DUSP6, probablemente a través de un mecanismo que implica la inducción a nivel transcripcional, activada por el BzATP y el EGF.

Por este motivo se analizó si el agonista BzATP y el EGF eran capaces de inducir la expresión de la fosfatasa DUSP6 a nivel de mensajero, mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Como se muestra en la Figura 51, tanto el BzATP como



**Figura 50. Niveles de expresión de DUSP6 inducidos por BzATP y EGF. Efecto de la inhibición del proteasoma.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con BzATP 300  $\mu$ M (**A**) y EGF 4  $\mu$ M (**B**) durante 30 min, 1, 2 y 4 h. Para las células tratadas con MG-132 10  $\mu$ M, este inhibidor del proteasoma se añadió 10 min antes que el BzATP analizándose posteriormente por inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de la proteína DUSP6 normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas.

el EGF, eran capaces de aumentar de manera rápida y significativa los niveles de mensajero de la fosfatasa DUSP6, a partir de los 30 minutos de estimulación. El patrón de expresión observado con ambos agonistas era ligeramente diferente, siendo más transitorio para el BzATP, y más mantenido en el tiempo para el EGF. Además, cuando se realizó la estimulación combinada con BzATP y EGF, se observó de nuevo un efecto aditivo sobre los niveles de mensajero de DUSP6, con respecto a los obtenidos con cada estimulación por separado, lo que indicaba que ambos estímulos estarían actuando a través de mecanismos de acción diferentes (Figura 51).

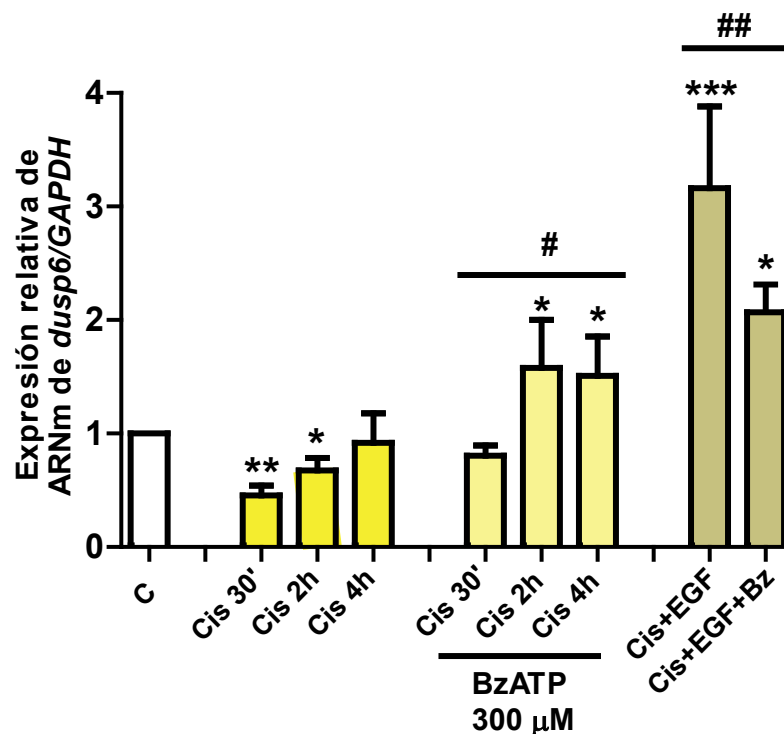


**Figura 51. Variaciones en los niveles de ARNm de *dusp6* en neuronas granulares estimuladas con BzATP y EGF.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con BzATP 300  $\mu$ M y/o EGF 4  $\mu$ M, obteniéndose el ARNm tras 30 min, 1, 2 y 4 h y analizándose mediante PCR cuantitativa. El tratamiento con U0126 10  $\mu$ M y con SB-202190, se realizó 20 min antes de añadir el BzATP. El histograma muestra los niveles relativos de ARNm de *dusp6*/*GAPDH* normalizados frente al control (C). \*\*\* $p$ <0.001 y \*\* $p$ <0.01 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p$ <0.001 cuando se comparan las estimulaciones en presencia y ausencia de U-0126.

Por otro lado, se quiso saber qué tipo de proteínas MAP quinasas estarían estaban implicadas en la activación de la DUSP6 a nivel transcripcional, empleando para ello inhibidores específicos de la ruta de las ERK1/2 y p38-MAPK, como el U-0126 y el SB-202119, respectivamente. Como se puede observar en Figura 51, las ERK1/2 son claves en el mantenimiento de la expresión constitutiva de

la fosfatasa DUSP6, puesto la expresión basal quedaba prácticamente abolida con el U-0126. Sin embargo, aún se sigue viendo cierto incremento en la DUSP6 con el BzATP. En cambio, el inhibidor de la p38-MAPK no tuvo efecto sobre la expresión basal de DUSP6, pero sí anuló el efecto mediado por el BzATP, lo que indicaba que este tipo de MAP quinasa podría ser importante en la señalización mediada por el receptor P2X7.

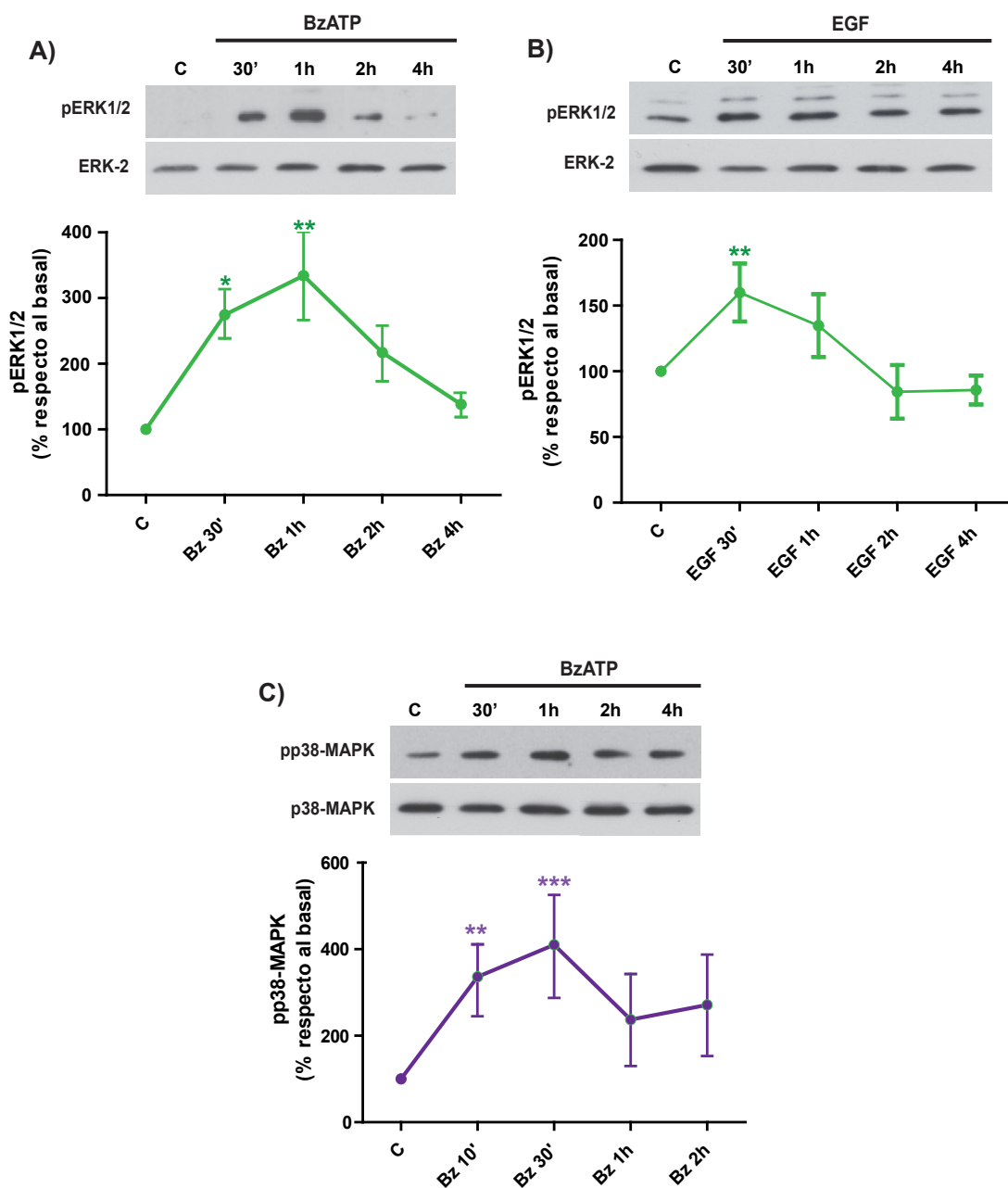
A continuación, se analizó también la expresión de DUSP6 a nivel de mensajero en células tratadas con cisplatino (Figura 52). De acuerdo con la disminución en la expresión de DUSP6 que se observa a nivel de proteína, a nivel transcripcional se observó una primera caída, que presentaba una tendencia a la recuperación a partir de las 2 y 4 horas de exposición al cisplatino. Cuando las células habían sido tratadas previamente con BzATP o EGF durante 2 horas, se recuperaban prácticamente los niveles basales de mensajero de DUSP6, a todos los tiempos ensayados. De nuevo, la combinación de BzATP y EGF tuvo un efecto aditivo sobre el restablecimiento de los niveles de mensajero de DUSP6 en presencia de cisplatino (Figura 52).



**Figura 52. Variaciones en los niveles de ARNm de *dusp6* en neuronas granulares con BzATP, EGF y/o cisplatino.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con BzATP 300  $\mu$ M y/o con EGF 4  $\mu$ M durante 2 h antes de añadir el cisplatino 20  $\mu$ g/ml, obteniéndose el ARNm tras 30 min, 2 y 4 h y analizándose mediante PCR cuantitativa. Los histogramas muestran los niveles relativos de ARNm de *dusp6*/GAPDH normalizados frente al control (C). \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01 y \* $p$ <0.05 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ## $p$ <0.01 y # $p$ <0.5 con respecto a los niveles de células tratadas con cisplatino.

Finalmente, como se ha comentado anteriormente, el efecto aditivo en la expresión de DUSP6 exhibido por el agonista nucleotídico y el factor de crecimiento, era indicativo de que ambos estímulos estuvieran activando rutas diferentes. Como ya se había visto que las MAP quinasas ERK1/2 y p38-MAPK podrían estar implicadas en la expresión de DUSP6 (Figura 51), se analizó el patrón de activación de estas proteínas mediado por BzATP y EGF. Como se muestra en las Figuras 53A y 53B, tanto el BzATP como el EGF estaban acoplados a la fosforilación de las ERK1/2 de manera transitoria.

Sin embargo, la activación de ERK1/2 por EGF resultó ser más rápida y breve, como ya se ha descrito para este factor de crecimiento. El máximo de activación obtenido con EGF a los 30 minutos podría explicar la expresión de DUSP6 que se observa a nivel de mensajero. En cambio, en el caso del BzATP, la activación de las proteínas ERK1/2 se mantenía elevada hasta las 2 horas, mientras que su efecto sobre el mensajero de DUSP6 caía rápidamente a partir de 1 hora. Cuando se analizó la fosforilación de p38-MAPK, solo el BzATP parecía estar acoplado a la activación de esta MAP quinasa. Se vio que el patrón de activación era diferente al observado para las ERK1/2, más transitorio, alcanzándose el pico máximo de fosforilación entre los 10 y 30 minutos (Figura 53C). Este patrón se ajustaba más al perfil observado en la expresión del mensajero de DUSP6. Por todo ello, estos resultados eran indicativos de que la expresión de la fosfatasa DUSP6 mediada por el BzATP y el EGF, podría estar mediada por las proteínas p38-MAPK y ERK1/2, respectivamente.

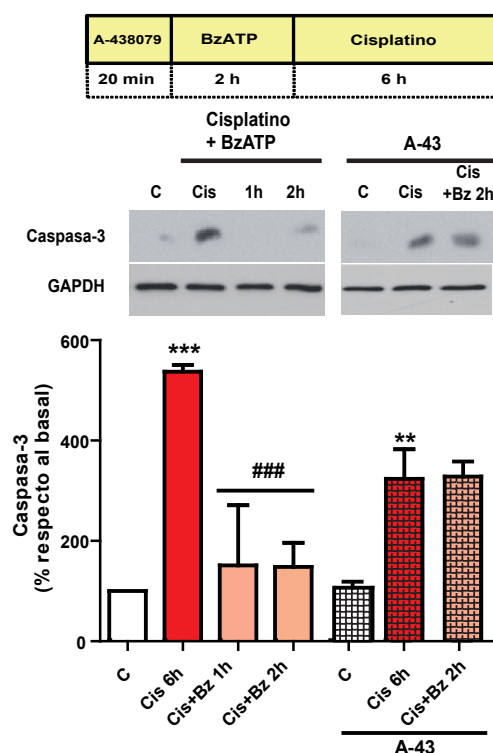


**Figura 53. Niveles de fosforilación de ERK1/2 y p38-MAPK inducidos por BzATP y EGF.** Las neuronas granulares mantenidas en medio de cultivo completo fueron tratadas con BzATP 300  $\mu$ M o EGF 4  $\mu$ M durante 30 min, 1, 2 y 4 h analizándose posteriormente por inmunotransferencia. Los histogramas muestran los valores densitométricos de las proteínas pERK1/2 (**A y B**) y pp38-MAPK (**C**) normalizados frente a GAPDH empleada como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas.

### 3.4. Efecto neuroprotector mediado por el BzATP frente a la apoptosis inducida cisplatino.

En consonancia con los resultados que se habían obtenido anteriormente, cuando se emplearon como estímulos citotóxicos la exposición a la luz UV y a la camptotecina, se estudió el efecto protector del BzATP frente al tratamiento con cisplatino. En este sentido se quería comprobar si existía una relación entre la neuroprotección inducida por el BzATP y su efecto sobre la regulación de la señalización de las ERK1/2 y la expresión de la proteína fosfatasa DUSP6.

En primer lugar se analizó la activación de la caspasa-3, como marcador de la muerte por apoptosis. Como era esperable, la preincubación con el agonista nucleotídico BzATP a distintos tiempos produjo una disminución casi completa del pico de activación de la caspasa-3 que se producía a las 6 horas de tratamiento con el cisplatino 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Figura 54). Además, este efecto se perdía en presencia del antagonista del receptor P2X7, A-438079.

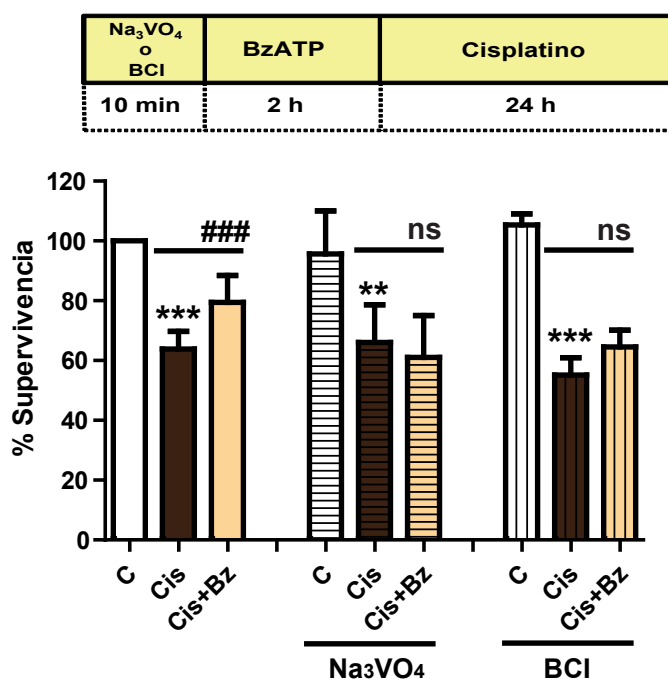


**Figura 54. Efecto de la activación del receptor P2X7 sobre los niveles de caspasa-3 activa en neuronas granulares expuestas al cisplatino.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo fueron pre-incubadas con A-438079 10  $\mu\text{M}$  durante 20 min y después con BzATP 300  $\mu\text{M}$  durante 1 y 2 h. Finalmente, las células fueron tratadas con cisplatino 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Los extractos celulares se recogieron 6 h tras el estímulo citotóxico y se analizaron los niveles de fragmento activo de caspasa-3 mediante inmunotransferencia. El histograma muestra los valores densitométricos de caspasa-3 normalizada frente a GAPDH, empleada como control de carga. \*\*\* $p < 0.001$  y \*\* $p < 0.01$  con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p < 0.001$  con respecto a los niveles de células tratadas con cisplatino.



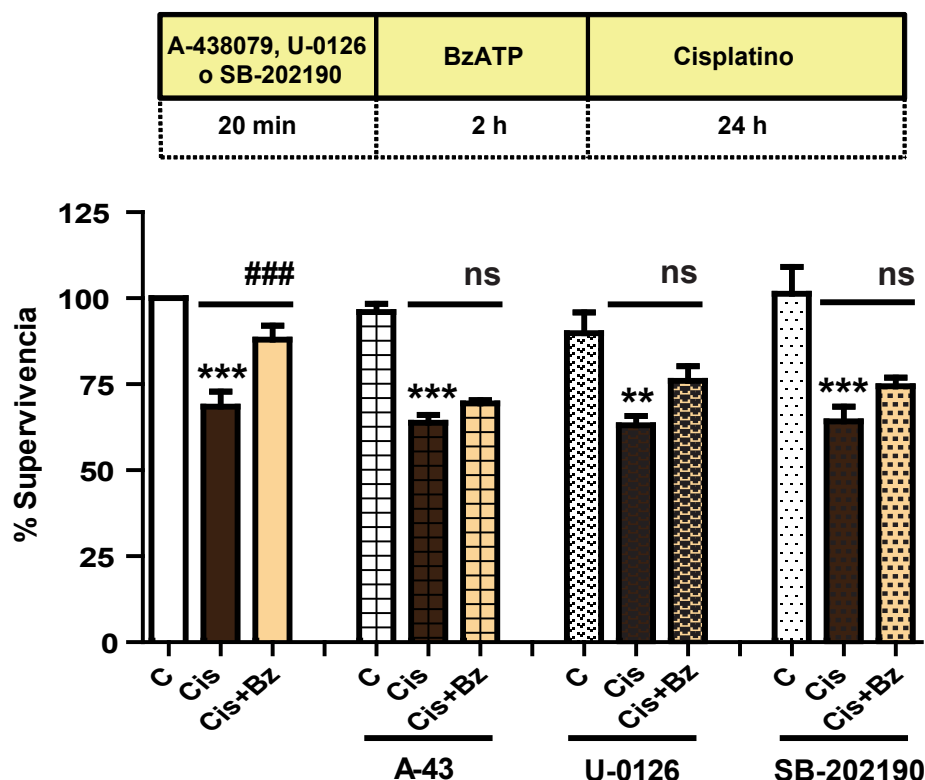
La magnitud del efecto neuroprotector del BzATP se evaluó en experimentos de viabilidad celular 24 horas después de la adición del cisplatino. El tratamiento previo con BzATP durante 2 horas fue suficiente para aumentar la supervivencia celular desde un 60 hasta cerca de un 90%.

A continuación se investigó el mecanismo mediante el cual el BzATP inducía la supervivencia celular, empleando para ello inhibidores de distintas proteínas de señalización. Cuando las células fueron tratadas con los inhibidores de tirosina fosfatasa, como el ortovanadato, y el inhibidor específico de DUSP6, BCI, se obtuvieron resultados similares, en los que se perdió por completo la capacidad neuroprotectora del BzATP. Estos resultados indicaban que en el efecto neuroprotector del BzATP estaba implicada su acción restaurando la actividad de proteínas fosfatasa (Figura 55).



**Figura 55. Neuroprotección mediada por el BzATP frente a la toxicidad inducida por cisplatino. Efecto de los inhibidores de tirosina fosfatasa.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo fueron pre-incubadas durante 10 min en presencia y ausencia de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 250 μM y BCI 1 μM, después se estimularon con BzATP 300 μM durante 2 h, antes de añadir el cisplatino 20 μg/ml. La viabilidad celular se evaluó 24 h después por medio del ensayo del MTT. \*\*\*p<0.001 y \*\*p<0.01 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ###p<0.001 y ns (no significativo) con respecto a los niveles de células tratadas con cisplatino.

Además, cuando se emplearon los inhibidores de la ruta de ERK1/2 y de p38-MAPK, el U-0126 y el SB-202190, respectivamente, se vio que ambas MAP quinasas era necesarias para el efecto protector completo del BzATP (Figura 56).



**Figura 56. Efecto del antagonista P2X7 y del inhibidor de las ERK1/2 en la neuroprotección mediada por el BzATP y el EGF frente a la toxicidad inducida por cisplatino.** Las neuronas granulares de cerebelo mantenidas en medio de cultivo completo fueron preincubadas en presencia y ausencia de A-438079 10  $\mu$ M, U-0126 10  $\mu$ M y SB-202190 durante 20 min. A continuación se estimularon con BzATP 300  $\mu$ M y con EGF 4  $\mu$ M durante 2 h. Finalmente se añadió el cisplatino 20  $\mu$ g/ml. La viabilidad celular se evaluó 24 h después por medio del ensayo de MTT. \*\*\* $p$ <0.001 y \*\* $p$ <0.01 con respecto a los niveles de células control no estimuladas. ### $p$ <0.001 y ns (no significativo) con respecto a los niveles de células tratadas con cisplatino.

Finalmente, de la misma manera que se había observado a nivel de la caspasa-3, cuando se hizo el pretratamiento con el antagonista A-438079, por sí mismo no supuso variaciones significativas en la viabilidad neuronal, pero bloqueó completamente el efecto neuroprotector del BzATP, lo que confirmaba que el efecto neuroprotector estaba mediado por un receptor P2X7 (Figura 56).

Todos estos datos son indicativos de que la regulación de la actividad fosfatasa DUSP6 por parte del receptor P2X7 participa en la neuroprotección frente al daño citotóxico producido por el cisplatino.

## *Discusión*





En la presente Tesis, se ha puesto de manifiesto que los nucleótidos, actuando a través de receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7, funcionan como un importante mecanismo de defensa frente a los estímulos apoptóticos que inducen estrés genotóxico en las neuronas granulares de cerebelo. Su mecanismo de acción se basa en la restauración de la señalización de las principales cascadas de MAP quinasas, que resulta alterada de manera significativa por la acción de este tipo de estímulos citotóxicos. Los nucleótidos contribuyen al mantenimiento de la actividad de las proteínas fosfatasa de especificidad dual (DUSPs) que actúan en los mecanismos reguladores de retroalimentación y que son esenciales para mantener la homeostasis y supervivencia neuronal. Este trabajo introduce nuevas aportaciones en las funciones de los receptores de nucleótidos, puesto que los nucleótidos no solo ejercen acciones propias a través de la activación de proteínas quinasas esenciales para la supervivencia neuronal, como las ERK1/2-MAPK y la GSK3, sino que también contribuyen a la regulación de estas señales cuando éstas se encuentran sobreactivadas o desreguladas, completando con ello el círculo de las acciones de los nucleótidos sobre las cascadas de las MAP quinasas y ampliando con ello las implicaciones fisiológicas para de estas señales en las neuronas granulares.

## **1. INDUCCIÓN DE ESTRÉS GENOTÓXICO EN NEURONAS GRANULARES DE CEREBELO.**

El planteamiento inicial del presente trabajo se realizó como continuación a los trabajos anteriores del grupo en los que se había demostrado un importante papel de los nucleótidos en la supervivencia de las neuronas granulares. Se quiso investigar si este papel neuroprotector de los nucleótidos se extendía a otro tipo de estímulos apoptóticos, más relacionados con situaciones de estrés, y cuáles eran los mecanismos disparados por estos nucleótidos para hacer frente a ellas. Se probaron, por ello, distintos tipos de tratamientos que tienen en común inducir estrés genotóxico, es decir, que conlleva daño en el DNA (Hetman y Gozdz, 2004). Entre ellos, se probó la camptotecina, que es un tipo de agente quimioterapéutico que inhibe la acción catalítica de la enzima topoisomerasa I (Kang y cols., 2004; Venditto y Simanek, 2010), aunque recientemente se ha demostrado que los efectos neurotóxicos que provoca este compuesto en las neuronas granulares podría deberse también a la inducción de enlaces cruzados entre proteínas y el ADN, como así también otras interacciones desconocidas, más allá de la inhibición de la actividad topoisomerasa (Uday Bhanu y Kondapi, 2010). Por ello, cuando se investigó la muerte provocada por camptotecina se vio que se

producía por apoptosis, ya que se observaba un incremento muy significativo del fragmento activo de la caspasa-3, el mediador clave en la vía intrínseca. Esta vía de apoptosis está muy bien caracterizada en las neuronas granulares, ya que es la que se activa principalmente por distintos tipos de estímulos apoptóticos, como la retirada de potasio en el medio y la privación de factores tróficos (Hetman y Gozdz, 2004). En cambio, aunque se ha visto que la activación de la caspasa-3 es un mediador importante en la muerte por radiación UV en otros sistemas, como los queratinocitos (He y cols., 2004), su activación no resulta ser tan potente en las neuronas granulares. Este estímulo tóxico provoca un incorrecto funcionamiento celular produciendo alteraciones en la homeostasis celular y en la expresión génica, que llevan a la pérdida del control del ciclo celular y la inducción de un fenotipo tumoral (Cadet y cols., 2001).

Nuestro trabajo se centró finalmente en el tratamiento con cisplatino como agente genotóxico. Esta droga se emplea como agente quimioterápico, y su mecanismo de acción se basa en la formación de aductos o puentes de unión entre guaninas adyacentes, impidiendo de ese modo que las polimerasas y demás enzimas encargadas de la replicación y reparación del ADN puedan ejercer su función. Este fenómeno provoca la muerte celular que mayoritariamente se da por apoptosis (Hetman y cols.; Gonzalez y cols., 2001).

En el modelo de las neuronas granulares, hemos observado que la acción del cisplatino también está asociada a la muerte celular por apoptosis de manera dependiente de caspasa-3, como ya se había descrito en la bibliografía, para lo cual se ha descrito una  $EC_{50}$  de 40  $\mu M$  (Wick y cols., 2004). Nuestros estudios se han llevado a cabo con una concentración de cisplatino de 20  $\mu g/ml$ , que se correspondía a una concentración de 66,5  $\mu M$  ligeramente por encima de dicho valor de  $EC_{50}$ . Además, esta dosis de cisplatino está en el mismo rango que la empleada en los tratamientos de quimioterapia (Podratz y cols., 2011). Hay que resaltar que uno de los efectos secundarios del cisplatino es su efecto neurotóxico, que limita los tratamientos prolongados con esta droga, y que estaría de acuerdo con el efecto inductor de muerte celular que hemos descritos. Este compuesto, es utilizado en diversos tipos de tumores, pero además también para el tratamiento del neuroblastomas y de otros tumores cerebrales, presentando grandes efectos secundarios relacionados con neurotoxicidad, ototoxicidad y neuropatía periférica (Khasabova y cols., 2012). El cisplatino también puede inducir defectos en el desarrollo, durante las etapas de diferenciación y en la sinaptogénesis celular del hipocampo y cerebelo (Bottone y cols., 2012). Además, estudios más recientes indican que esta droga citotóxica es capaz de atravesar

la barrera hematoencefálica induciendo muerte celular en neuronas granulares de la capa granulosa externa (Bernocchi y cols., 2011; Cerri y cols., 2011). Con estos antecedentes, el estudio de su efecto en poblaciones neuronales, como las neuronas granulares, puede aportar nuevas implicaciones sobre su mecanismo de acción y sobre los mecanismos de defensa que pone en marcha la célula para limitar sus efectos neurotóxicos.

## 2. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE LA ACTIVACIÓN DE LAS MAP QUINASAS POR ESTRÉS GENOTÓXICO.

Un efecto conocido de los agentes que inducen daño al DNA es la desregulación de numerosas cascadas de señalización, entre ellas la sobreactivación de las rutas de las MAP quinasas (Brozovic y Osmak, 2007). En este trabajo, se analizó en primer lugar la activación mantenida de las ERK1/2 en las células granulares de cerebelo, como punto en común de la señalización de muerte inducida por la luz UV y la camptotecina. Nuestros resultados indicaban que el mayor nivel de fosforilación que se observaba con la luz UV se correspondía con un mayor porcentaje de muerte celular. Cuando se analizaron las MAP quinasas asociadas a estrés tras el tratamiento con cisplatino y luz UV, también se observó una sobreactivación de la proteína p38-MAPK, pero no de las proteínas JNK.

La señalización activada de las MAP quinasas asociada con agentes citotóxicos está ampliamente documentada en la bibliografía. La activación crónica de las proteínas ERK1/2 inducida por determinados estímulos, como las bajas concentraciones de potasio en los cultivos de neuronas granulares de cerebelo, parece mediar la muerte neuronal por daño en la membrana plasmática y por condensación de la cromatina nuclear derivada de la translocación de las ERK1/2 al núcleo (Subramaniam y cols., 2004). Las señales como el IGF-I y FGF, que son capaces de prevenir esta acumulación nuclear, tienen un efecto protector (Subramaniam y cols., 2003; Subramaniam y cols., 2004; Subramaniam y cols., 2005). Este mecanismo se ha descrito también en astrocitos de corteza, en los que la muerte celular inducida por las especies reactivas de oxígeno implica la sobreactivación de las ERK1/2 en el núcleo (Shinozaki y cols., 2005; Shinozaki y cols., 2006), y en líneas celulares derivadas de queratinocitos tras la exposición a la radiación UV (He y cols., 2004). Asimismo en neuronas corticales las ERK1/2 resultan activadas y retenidas en el núcleo por concentraciones excitotóxicas de glutamato que llevan a la apoptosis (Stanciu y cols., 2000; Stanciu y DeFranco, 2002). En células tumorales se han descrito asimismo efectos contrarios, tanto pro-apoptóticos como neuroprotectores para la activación de las ERK1/2 en respuesta



al cisplatino, (Cui y cols., 2000; Mandic y cols., 2001; Muscella y cols., 2005).

En cuanto a la activación de la p38-MAPK, esta proteína asociada a señales de estrés, citoquinas proinflamatorias, etc., se la ha relacionado de manera más directa con la muerte celular. Sobre todo cuando la sobreactivación tiene lugar en células de tipo tumoral que han sido expuestas al cisplatino o luz UV (Mansouri y cols., 2003; Brozovic y cols., 2004; Villedieu y cols., 2006). Sin embargo existen cada vez más evidencias de que estas MAPKs también juegan un papel dual en el mantenimiento del balance supervivencia/apoptosis (Chouinard y cols., 2002; Bachelor y Bowden, 2004). En células HEK 293 y timocitos, se ha descrito que la fosforilación de la p38 y su translocación nuclear representa un mecanismo de defensa frente a la luz UV para facilitar la fosforilación de dianas nucleares de la p38-MAPK que llevan a parada de ciclo celular y reparación del DNA (Wood y cols., 2009). La contribución de la p38-MAPK a la función neuronal, tampoco está del todo esclarecida. En la línea de feocromocitoma PC12, la retirada de NGF conduce a la sobreactivación de la p38-MAPK y a la muerte celular, pero no ocurre así en las neuronas simpáticas o granulares tras la retirada de factores tróficos (Xia y cols., 1995; Yamagishi y cols., 2003). Pero, por otro lado, la activación crónica de la p38 en combinación con la activación transitoria de las ERK1/2, también es requerida para la diferenciación neuronal inducida por NGF en las PC12 (Morooka y Nishida, 1998). En relación con estas acciones, la activación de la p38-MAPK por NGF en neuronas de ganglio dorsal (DRGs), pone en marcha el programa de expresión génica mediado por p38-MAPK que conduce a un aumento de la expresión de los receptores TRPV1, contribuyendo a aumentar la sensibilidad al dolor (Ji y cols., 2002). Finalmente, existen numerosos ejemplos en la literatura sobre la participación de la p38-MAPK en procesos de plasticidad sináptica, de manera complementaria o alternativa a las ERK1/2. En este sentido, en neuronas simpáticas la actividad p38-MAPK es indispensable para su transdiferenciación al fenotipo colinérgico inducido por citoquinas, CNTF y LIF (Loy y cols., 2011). Incluso, la p38-MAPK parece ser un importante mediador de la LTD (depresión a largo plazo) inducida por el receptor de glutamato metabotrópico, mGluR2, las sinapsis excitadoras de las neuronas piramidales de las regiones CA3 y CA1 de hipocampo (Takeda y Ichijo, 2002; Correa y Eales, 2012).

Por tanto, se puede decir que el aumento sostenido de la activación de las proteínas ERK1/2 y p38 no implica siempre las mismas consecuencias en el destino celular, sino que es específico del tipo celular, del tipo de estímulo y de la duración de la señal. En general, esta señalización conduce a la muerte

celular cuando está asociada al estrés oxidativo y a la acumulación mantenida en el núcleo. En cambio, en otros casos, las ERK1/2 y la p38 resultan activadas como mecanismo de defensa, que lleva implícito la expresión de genes anti-apoptóticos. Este parece ser el caso de lo que ocurre en nuestro modelo, las neuronas granulares expuestas al cisplatino, porque la inhibición de la ruta de MEK-ERK1/2 y de p38 con el U0126 y SB212090, no protegen de la muerte celular por sí mismo, sino que se requiere para la respuesta de supervivencia mediada por los nucleótidos (Harper y LoGrasso, 2001; Hetman y Gozdz, 2004; Cuenda y Rousseau, 2007; Subramaniam y Unsicker, 2010).

Finalmente, cuando se examinó el tercer tipo de MAP quinasa estaban sobreactivadas con el cisplatino, llamó la atención que una de las MAP quinasas más asociadas con la muerte celular, como son las JNK, apenas se vieran afectadas por ninguno de los tratamientos genotóxicos en las neuronas granulares. A raíz de nuestros resultados parece que las JNK no están jugando un papel claro en el proceso apoptótico inducido por la luz UV y el cisplatino. Este hecho se explicaría porque los niveles basales de JNK ya se habían descrito que son elevados en estas neuronas, y no son capaces de aumentar más con los distintos estímulos tóxicos, como la retirada de  $K^+$ , o la exposición a concentraciones tóxicas de  $Cu^{2+}$ , mientras que se seguirían activando las ERK1/2 y p38-MAPK (Subramaniam y cols., 2003; Yamagishi y cols., 2003; Chen y cols., 2009). De acuerdo con esto, en neuronas de ganglio dorsal (DRGs) la apoptosis inducida por el cisplatino también depende de cambios en la expresión de factores pro-apoptóticos mediados por las ERK1/2 y p38-MAPK, mientras que la activación de JNK es bastante más reducida (Scuteri y cols., 2009). La toxicidad de las JNK parece estar más asociadas con su translocación al núcleo inducida por luz UV en otros tipos celulares, como la línea celular HEK (Cadalbert y cols., 2005). No obstante, se han descrito para las JNK tanto efectos anti-apoptóticos pro-apoptóticos (Tournier y cols., 2000; Brozovic y cols., 2004; Karin y Gallagher, 2005; Koyama y cols., 2006), por tanto, de nuevo el papel de la activación de las JNK parece depender del contexto celular y del tipo de señal (Chen y cols., 1996).

### **3. REGULACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FOSFATASAS DE ESPECIFICIDAD DUAL POR RECEPTORES DE NUCLEÓTIDOS.**

El presente trabajo pone de manifiesto que la modulación de la actividad de las proteínas MAP quinasas es de crucial importancia para la regulación de numerosos procesos biológicos y para la supervivencia neuronal. De hecho, es necesaria la terminación adecuada de la señalización de estas cascadas para

asegurar que la célula recupere su estado basal y tenga capacidad de responder ante subsiguientes estímulos. Existen múltiples puntos de control en las cascadas de las MAP quinasas, a nivel de las proteínas de acoplamiento, de las proteínas con actividad GTPasa, de los propios receptores tirosina quinasas, etc. (Junttila y cols., 2008). Pero sin duda, la regulación a nivel de la inactivación de la señal por proteínas fosfatasas está emergiendo como un mecanismo novel que resulta clave en el mantenimiento de estas cascadas de señalización intracelular.

La inactivación de la señalización de las MAP quinasas por las PSPs clásicas, como la PP2A, está bien documentada, aunque estas fosfatasas no son específicas de las proteínas MAP quinasas, sino que presentan una amplia variedad de proteínas diana (Junttila y cols., 2008). Por ello la implicación directa de sus efectos sobre una ruta en particular es muy difícil de evaluar. Además, parecen intervenir más a nivel de mecanismos que funcionan a corto plazo, que tienen que ver con la activación transitoria de las ERK1/2, pero no en las acciones mediadas por los factores de crecimiento. En este sentido, en nuestro mismo modelo, las neuronas granulares, se ha implicado a la PP2A en la finalización de la señal de las ERK1/2 activada por receptores de estrógenos no nucleares acoplados a proteínas G (Belcher y cols., 2005).

Por otro lado, la familia de PTPs están más implicadas asimismo en la regulación de la señalización de las MAP quinasas, pero ejerciendo su acciones también a corto plazo y a nivel del receptor tirosina quinasa. La fosfatasa específica de estríado STEP, se ha propuesto como un importante regulador de la señalización de las ERK1/2 en neuronas. La activación del receptor de NMDA en neuronas estriatales media la activación de esta fosfatasa, que explicaría la inactivación de la señal de ERK1/2 inducida por este receptor. El receptor de NMDA activa la fosfatasa dependiente de calcio, calcineurina, que, a su vez, desfosforila y activa la STEP (Paul y cols., 2003). Además, la fosfatasa STEP también juega un papel importante en la supervivencia neuronal, ya que su degradación durante la exposición a concentraciones tóxicas de glutamato provoca una sobreactivación de la p38-MAPK que lleva a la muerte celular (Poddar y cols., 2010). De hecho, la primera referencia sobre la regulación de la homeostasis de las proteínas MAP kinasas por receptores nucleotídicos implicaba este tipo de fosfatasas. En astrocitos corticales se ha descrito que las proteínas tirosina fosfatasas PTP2B resultaban activadas por los receptores de ADP P2Y<sub>1</sub>, y eran las responsables de la restauración de la señalización normal de las ERK1/2 sobreactivadas durante el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de la protección frente a la muerte por apoptosis

(Shinozaki y cols., 2005).

Finalmente, además de las PSPs y las PTPs, las fosfatasa de especificidad dual DUSPs que son específicas de MAP quinasas, también denominadas MKPs, se perfilan cada vez más como los reguladores más relevantes de las cascadas de las MAP quinasas, que regulan no solo la duración sino también la intensidad de la señal. Existen distintos tipos de DUSPs con especificidades propias y no redundantes, y participan en múltiples y complejos mecanismos de regulación a través de lazos (loops) de retroalimentación negativa y reforzamiento positivo, tanto a nivel citosólico como nuclear.

Nuestro trabajo presenta la novedad de describir por primera vez el acoplamiento de receptores de nucleótidos a la activación de las fosfatasa de especificidad dual, en neuronas y de relacionarlas con la supervivencia neuronal. El estudio de la actividad de las fosfatasa DUSPs en las neuronas granulares surgió de la necesidad de encontrar un mecanismo que explicara las acciones neuroprotectoras de los nucleótidos frente a los estímulos de estrés genotóxico, como la luz UV, camptotecina y cisplatino, cuyo principal modo de acción era la activación crónica de las cascadas de las MAP quinasas, especialmente a nivel de la p38-MAPK y las ERK1/2. El hecho de que los agonistas de los receptores nucleotídicos P2Y<sub>13</sub> y P2X7 tuvieran efecto desfosforilando las MAP quinasas sobreactivadas ya llevaba implícita la participación de algún tipo de proteína fosfatasa. En esta dirección apuntaban los resultados obtenidos con ortovanadato, un inhibidor general de tirosina fosfatasa, que aumentaba todavía más los niveles de fosforilación de las proteínas ERK1/2 y p38-MAPK, por encima de los obtenidos con el cisplatino, lo que indicaba que este tipo de fosfatasa jugaban un papel clave en la finalización de estas cascadas de señalización en las neuronas granulares. Teniendo en cuenta el tipo de proteínas que resultaban sobreactivadas por los distintos tipos de estímulos de estrés genotóxico, decidimos investigar algunos subtipos de fosfatasa DUSPs que tuvieran como sustratos a las ERK1/2 y a la p38-MAPK. Entre ellas, la DUSP2 y DUSP6 parecían ser buenos candidatos, puesto que además, aparecían altamente expresadas en unos estudios previos de expresión que realizamos mediante la técnica de microarrays en neuronas granulares estimuladas con los agonistas nucleotídicos, P2Y<sub>13</sub> y P2X7. Aunque en principio, en los estudios con la luz UV parecía que ambos tipos de receptores nucleotídicos iban a mediar acciones parecidas, puesto que ambos eran capaces de desfosforilar las proteínas ERK1/2, pronto se vio que su mecanismo de protección frente a los agentes genotóxicos era muy diferente. En primer lugar,

solo el agonista P2Y<sub>13</sub>, 2MeSADP, tenía acción desfosforilando la p38-MAPK. Mientras que no lo hacía así el agonista P2X7, BzATP, puesto que la señalización de este receptor está acoplada a la fosforilación y activación transitoria de la propia p38-MAPK.

### **3.1. El receptor nucleotídico P2Y<sub>13</sub> en la regulación de la actividad y expresión de la proteína fosfatasa DUSP2.**

El efecto mediado por el agonista nucleotídico 2MeSADP resultó ser más claro sobre la fosforilación de la proteína p38-MAPK, puesto que el agonista nucleotídico era capaz de restablecer prácticamente los niveles basales de la p38. Además, los niveles de p38-MAPK fosforilada que subían 5 - 8 veces por encima de los basales, siempre fueron mucho más elevados que los obtenidos para las ERK1/2, que solo subían entre 2 - 3 veces. Este patrón de respuesta era común para los tratamientos realizados con cisplatino y luz UV. Esto era lógico, puesto que los niveles basales de ERK1/2 ya son normalmente elevados en presencia de los factores tróficos del medio de cultivo, puesto que constituyen una señalización muy importante para el mantenimiento y la supervivencia de las neuronas granulares (Subramaniam y Unsicker, 2010).

En la búsqueda de la proteína fosfatasa adecuada, nos fijamos en la distribución subcelular de las proteínas MAP quinasas activadas durante el tratamiento con el cisplatino, puesto que esto nos ayudaba a distinguir las fosfatasas nucleares de las citosólicas. Como estaba descrito en la bibliografía en otros tipos celulares, la proteína p38-MAPK se encontraba activada fundamentalmente en el núcleo durante el tratamiento con cisplatino. La acumulación de p38 fosforilada en el núcleo se revertía casi completamente en las células tratadas con 2MeSADP, lo cual indicaba que su actividad sobre una proteína fosfatasa que actuaba a nivel nuclear. En experimentos no mostrados en los que se había separado fracciones de proteínas nucleares y citosólicas obtenidas de neuronas granulares tratadas durante 6 horas con cisplatino, se vio que el 2MeSADP también era capaz de reducir los niveles de ERK1/2 fosforiladas en la fracción nuclear. Teniendo en cuenta estos resultados, una de las proteínas fosfatasas que cumplía estos requisitos, localización nuclear y especificidad frente a ambos tipos de sustratos, p38-MAPK y ERK1/2, era la proteína DUSP2. Por ello nos centramos en el análisis de su expresión en las neuronas granulares.

En primer lugar, se analizó si el estado de sobreactivación de las p38-MAPK y ERK1/2 inducida por el estrés genotóxico, estaba relacionado con alteraciones en el nivel de expresión o en la actividad de la fosfatasa DUSP2. Se



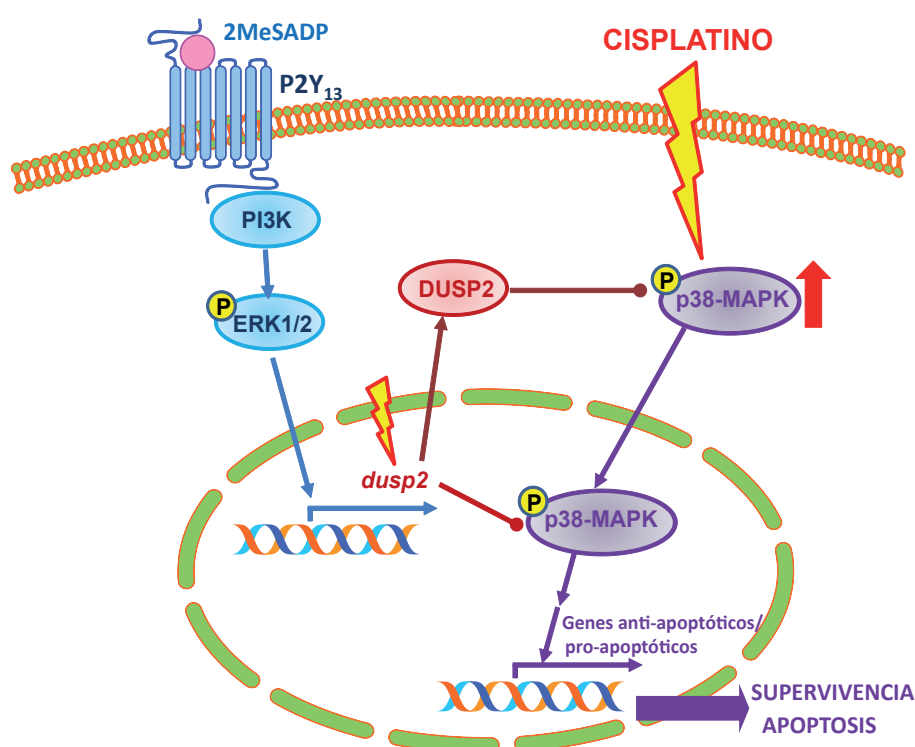
pudo comprobar que, efectivamente, existía un patrón inverso muy claro entre la fosforilación de la p38-MAPK y la disminución de la proteína DUSP2, que era reproducible tanto con el tratamiento con cisplatino como con la luz UV. Por tanto, el déficit en la actividad de la fosfatasa en DUSP2 que se produciría como consecuencia del tratamiento con cisplatino, podría ser el mecanismo responsable de la sobreactivación de la p38-MAPK en las neuronas granulares. En cambio, en las neuronas granulares, la acción de DUSP2 sobre la desfosforilación de las ERK1/2 no es tan clara en comparación con la producida sobre la p38-MAPK, y es posible que a este efecto, contribuyan las actividades de otras proteínas fosfatasas de manera conjunta.

La disminución en los niveles de la DUSP2 podría deberse a varios tipos de procesos reguladores. En primer lugar, la inactivación de la actividad catalítica de las DUSPs parece ser el mecanismo que tiene lugar en las neuronas corticales expuestas a concentraciones citotóxicas de glutamato. La sobreactivación de las ERK1/2 inducida en estas condiciones está asociada a la generación de especies reactivas de oxígeno, que oxidarían residuos tioles cruciales para la actividad de las DUSP6. Generalmente la desregulación de las MAP quinasas debida a la inactivación de las DUSPs por daño oxidativo conduce a la muerte celular (Hetman y Gozdz, 2004; Levinthal y Defranco, 2005). Este tipo de mecanismo no parecía estar operando en las neuronas granulares expuestas al cisplatino, puesto que, como se ha comentado anteriormente, la sobreactivación de la p38-MAPK y ERK1/2 no parecía llevar a la muerte celular.

La inhibición a nivel transcripcional del gen *dusp2* como consecuencia de la exposición a los agentes genotóxicos, se perfilaba como un mecanismo más factible, ya que está directamente relacionado con su mecanismo de acción sobre el ADN, al verse afectados los procesos de replicación y transcripción basales y necesarios para la supervivencia celular. El análisis del mensajero para *dusp2* confirmó esta hipótesis, y se encontró que los niveles de expresión disminuían progresivamente durante el tiempo de tratamiento con cisplatino. El agonista 2MeSADP tenía el efecto de mantener de los niveles transcripcionales de *dusp2* en torno a los basales, indicando que el receptor P2Y<sub>13</sub> estaba acoplado a la expresión de *dusp2*. La rápida expresión del gen *dusp2* inducida por 2MeSADP, a partir de los 30 min, está de acuerdo con su carácter inducible, al tratarse de un gen de respuesta temprana (IEG). Además concuerda con el aumento que se produce a nivel de la proteína, entre 1 y 2 h, tras la estimulación con el agonista nucleotídico. Asimismo, la expresión de DUSP2 resultó ser dependiente de la

señalización canónica descrita por nosotros para el receptor  $P2Y_{13}$  en neuronas granulares, que implica la activación de las ERK1/2 por una vía acoplada a la PI3K (Ortega y cols., 2011).

De esta primera parte del trabajo, se puede concluir que la activación transitoria de las ERK1/2 mediada por el receptor  $P2Y_{13}$  activa entre otras señales, la expresión de la fosfatasa DUSP2. Esta participa como un importante regulador negativo en mecanismos de retroalimentación para restaurar las funciones de las MAP quinasas a nivel de la transcripción génica. (Figura 57).



**Figura 57. Mecanismo de acción del receptor  $P2Y_{13}$  frente al estrés genotóxico.** El cisplatino y la luz UV provocan una inhibición transcripcional de la fosfatasa DUSP2 de modo que se produce una sobreactivación de p38-MAPK a lo largo del tiempo. El 2MeSADP contrarresta la toxicidad del cisplatino y la luz UV debido a que induce la expresión de DUSP2 en una vía dependiente de PI3K-ERK1/2 restaurando los niveles basales de p38-MAPK. Este efecto del 2MeSADP, contribuye además, al aumento de la supervivencia de las neuronas granulares frente al daño genotóxico.

Nuestros datos representan las primeras evidencias de la expresión y actividad de esta fosfatasa dual en células neuronales acoplada a la activación de un receptor diferente a los factores de crecimiento. En sistema nervioso, los pocos datos que se encontraban de la fosfatasa DUSP2, hacían referencia a su inducción en el contexto de situaciones de estrés o daño cerebral. Se ha descrito que se



activa su transcripción en condiciones de isquemia, encontrándose aumentado el mensajero en neuronas hipocámpales resistentes a 30 minutos de isquemia, pero no en las neuronas piramidales del área CA1, que es más vulnerable (Wiessner, 1995). Asimismo, también se ha observado la expresión de DUSP2 en neuronas de hipocampo en las regiones CA1 y CA3, en respuesta a crisis de tipo epiléptico inducidas tras la inyección de ácido kaínico, que estaría contribuyendo a la regulación de la señalización de las MAP quinasas alteradas en estas condiciones de daño cerebral (Boschert y cols., 1997).

En general, las funciones de la DUSP2 se conocen fundamentalmente a partir de los datos obtenidos de tejidos hematopoyéticos con alto contenido en linfocitos T, como el timo, bazo, ganglios linfáticos, sangre periférica y en otros órganos como el hígado y el cerebro (Rohan y cols., 1993; Boschert y cols., 1997; Lisbona y cols., 1997; Gum y cols., 2003; Wei y cols., 2013). En este contexto, la DUSP2 estaba relacionada con otro tipo de señalización, y se pensaba que era un producto de la actividad transcripcional de la proteína p53, que estaría mediando el inicio del efecto apoptótico y la supresión de la tumorigénesis (Yin y cols., 2003). Aunque se trata de células del sistema inmune, en los linfocitos B y T, sin embargo, la expresión de DUSP2 también era inducida rápidamente a través de la activación de la señalización ERK1/2 (Rohan y cols., 1993; Grumont y cols., 1996), y actuaban desfosforilando específicamente, tanto a ERK1/2, como a p38-MAPK *in vitro* (Ward y cols.; Chu y cols., 1996). Por tanto, estaría de acuerdo con el mecanismo novel que hemos propuesto para el receptor P2Y<sub>13</sub> en las neuronas granulares.

### **3.2. El receptor nucleotídico P2X7 en la regulación de la actividad y expresión de la proteína fosfatasa DUSP6.**

Después de confirmar la relación entre la fosfatasa DUSP2 y la p38, era necesario investigar qué tipo de fosfatasa estaba mediando la desfosforilación de las proteínas ERK1/2 inducida por los agonistas nucleotídicos 2MeSDAP y BzATP. Aunque no se puede descartar la participación de la DUSP2 regulando a las ERK1/2, ya que está también descritas como sustratos de estas fosfatasas (Zhang y cols., 2005), estaba claro que el 2MeSADP no prevenía completamente la desfosforilación de las ERK1/2 de la misma manera que lo hacía sobre la p38-MAPK. Por ello buscamos otro tipo de fosfatasas DUSPs más específicas de las ERK1/2.

Para este tipo de estudio, decidimos emplear solo el agonista nucleotídico específico del receptor P2X7. En primer lugar, porque su efecto sobre las ERLK1/2

era siempre algo más potente que el obtenido con el 2MeSADP. En segundo lugar, porque el BzATP solo afectaba a la desfosforilación de las proteínas ERK1/2, y no de otro tipo de MAP quinasa, por lo que sería más fácil analizar su mecanismo de acción. En efecto, el BzATP, no solo no desfosforilaba la p38-MAP quinasa, como el 2MeSADP, sino que estaba acoplado a su fosforilación y activación, de una manera transitoria. Además, esta señalización acoplada a la p38-MAPK del receptor P2X7 no parecía ser dependiente de la activación de las proteínas ERK1/2, puesto que los perfiles temporales de activación para ambas proteínas eran muy diferentes, siendo más temprana y transitoria la activación de la p38-MAPK.

Teniendo en cuenta esta señalización, en un principio se pensó que la fosfatasa implicada en la desfosforilación de las proteínas ERK1/2 mediada por el BzATP era una fosfatasa clásica, como la PP2A. Puesto que está descrito un mecanismo de regulación cruzada entre las MAP quinasas, según el cual, la fosfatasa PP2A es una diana de la proteína p38-MAPK, que resultaría activada por el receptor P2X7. La PP2A actuaría entonces sobre su sustrato MEK-1, la quinasa que fosforila y activa ERK1/2 (Junttila y cols., 2008). Es decir que la p38-MAPK está regulando de manera negativa a las proteínas ERK1/2. Nosotros hemos comprobado en neuronas granulares que un loop de este tipo debe de estar funcionando, puesto que los niveles de fosforilación de las ERK1/2 estaban aumentados de manera significativa en presencia de un inhibidor selectivo de la p38-MAPK, como es el SB-202190 (datos no mostrados). Además, la hiperfosforilación obtenida con el ortovanadato sobre las proteínas ERK1/2, tanto a nivel basal como tras el tratamiento con cisplatina, también podía explicar este mecanismo. Sin embargo, cuando se miró el efecto del inhibidor específico de DUSP6, BCI, también se vio aumento en los niveles de fosforilación de las ERK1/2, aunque no de manera tan acusada como cuando se usó el ortovanadato. Además, el aumento no se producía apenas en los niveles basales, sino que era más significativo sobre los tratamientos realizados con cisplatina. Estos datos apuntaban a que en la regulación de la señalización de las ERK1/2 podrían estar participando varios tipos de proteínas fosfatasas, tanto PSP clásicas, como de especificidad dual. Puesto que no existen inhibidores selectivos para la PP2A, seguimos estudiando las DUSPs implicadas en este efecto.

La DUSP6 es una fosfatasa citoplásmica y constitutiva que desfosforila selectivamente las ERK1/2 y es específica de células neurales (Muda y cols., 1996). Como se ha citado anteriormente, la DUSP6 nos había aparecido como

uno de los genes que más se expresaban en las neuronas granulares estimuladas con BzATP. Además, para el caso de esta fosfatasa, ya existían referencias en la bibliografía sobre su papel en el mantenimiento de la señalización de las ERK1/2 en neuronas corticales sometidas al tratamiento con cisplatino. Los efectos del cisplatino producían la inhibición transcripcional de fosfatasas específicas de cerebro, DUSP3/VRK3 y DUSP6, lo que originaba un déficit en la desfosforilación de las ERK1/2, inicialmente provocada por la actividad de los receptores de NMDA (Gozdz y cols., 2003; Gozdz y cols., 2008). Con todos estos antecedentes, iniciamos nuestros estudios sobre la fosfatasa DUSP6 en las neuronas granulares expuestas al cisplatino.

De igual manera que se había descrito en las neuronas corticales, el tratamiento con cisplatino también provocaba alteraciones en los niveles de expresión de la fosfatasa DUSP6 en las neuronas granulares. Siendo una fosfatasa de tipo constitutivo, sus niveles basales eran fácilmente detectables. Como era esperable, el tratamiento con cisplatino produjo una disminución drástica y progresiva de la proteína DUSP6, que llevó prácticamente a su pérdida completa a las 6 horas, tiempo que coincidía con el pico máximo de fosforilación de las ERK1/2. Todo ello parecía indicar que la caída en la DUSP6 provocada por el tratamiento con cisplatino podría ser debido a un mecanismo de inhibición transcripcional, como el que se había descrito en neuronas corticales.

De nuevo, la inhibición transcripcional del gen *dusp6*, aparecía como el mecanismo de acción más probable que se ponía en marcha por el tratamiento con cisplatino. Sin embargo, cuando se analizaron los niveles de mensajero de *dusp6* en células expuestas a esta droga citotóxica, se vio en un principio una disminución en el mensajero a tiempos más cortos, que iba seguida de un aumento entre las 2 y 4 horas de tratamiento. Es decir, que en todo caso, el cisplatino activaba la transcripción de DUSP6, en lugar de inhibirla. Esto significaba un comportamiento muy diferente al observado anteriormente con la fosfatasa inducible DUSP2. Pero concordaría con los datos que existen en la bibliografía sobre fosfatasas que son inducidas transcripcionalmente en respuesta a estímulos de tipo genotóxico. Este es el caso de la DUSP1, cuya expresión se induce en fibroblastos expuestos a la luz UV, a través de un mecanismo dependiente de p38-MAPK y de la activación sus dianas nucleares (MSK1, CREB, ATF1), que acabaría restableciendo la sobreactivación de los diferentes tipos de MAP quinasas que resultan activadas en estas células y que van a apoptosis como las JNK, p38-MAPK (Staples y cols.).

En nuestro caso la inducción de DUSP6 depende de manera inequívoca de las ERK1/2, puesto que la incubación con el inhibidor U-0126 reduce drásticamente los niveles basales del gen *DUSP6*. De hecho la transcripción de DUSP6 se ha descrito que es inducida por la activación de factores de transcripción dependientes de las ERK1/2, Ets-1 y Ets-2, que se unen al promotor de *DUSP6* (Nunes-Xavier y cols., 2010; Zhang y cols., 2010), indicando que la estabilidad del mensajero de DUSP6 es regulada a través de la vía MEK-1/ERK. Por tanto, nuestros resultados apuntan a que la inducción transcripcional de DUSP6 en respuesta a cisplatino en neuronas granulares actuaría como mecanismo de defensa de retroalimentación negativo para restaurar la señalización desregulada de estas MAP quinasas.

Por tanto, si la desaparición de la proteína DUSP6 no se debía a la inhibición transcripcional, podría explicarse por otro tipo de alteraciones que condujeran a su degradación. Para las proteínas DUSPs se han descrito diferentes mecanismos de regulación a nivel post-traducciona, que implican cambios en la estabilidad del mensajero, mediante su asociación con distintas proteínas reguladoras, como así también, cambios en la estabilidad de la proteína, que implican la fosforilación de la DUSP por las MAP quinasas que son sus propios sustratos (Dickinson y Keyse; Patterson y cols.). Este último tipo de mecanismo se ha descrito para la DUSP6 y para la DUSP1, que son fosforiladas por las proteínas ERK1/2 provocando de ese modo su degradación vía proteasoma (Choi y cols., 2006; Jurek y cols., 2009). Para la DUSP6, en concreto, se han identificado los residuos que son fosforilados por las ERK1/2 en el dominio catalítico y que llevan a la fosfatasa a su degradación por el proteasoma (Marchetti y cols., 2005). En experimentos no mostrados, el pretratamiento con el inhibidor U0126 era capaz de prevenir la desaparición de la proteína DUSP6 durante el tratamiento con cisplatino. Por tanto, podemos concluir que la activación de las ERK1/2 inducida por el cisplatino, fosforila en una primera fase a la DUSP6, siendo ésta una señal para su degradación. La desaparición de la proteína DUSP6 se haría evidente a partir de un tiempo más mantenido, que explicaría la fosforilación crónica de las ERK1/2 durante la exposición al cisplatino.

A continuación estudiamos si el efecto del agonista del receptor nucleotídico P2X7, BzATP, revirtiendo la sobrefosforilación de las proteínas ERK1/2 durante el tratamiento con cisplatino, se debía a su acción alterando la expresión o la estabilidad de la fosfatasa DUSP6. Teniendo en cuenta que el receptor P2X7 estaba acoplado a la fosforilación transitoria de las ERK1/2, era lógico pensar que podía

presentar efectos duales sobre la fosfatasa DUSP6, tanto su degradación como su inducción transcripcional dependiente de estas MAP quinasas. La función tiempo realizada con BzATP reveló una respuesta bifásica sobre la expresión de DUSP6. En una primera etapa, el BzATP producía una caída en los niveles de la proteína DUSP6. La caída en el 50 % de los niveles de DUSP6 se producía entre 1-2 horas, después del pico de activación de las ERK1/2 producido por el BzATP entre los 30 min y 1 hora. El empleo del inhibidor del proteasoma, MG132, fue capaz de prevenir la disminución de la proteína DUSP6 inducida por BzATP, indicando que, efectivamente, el mecanismo de degradación de la DUSP6 estaba siendo activado por el agonista nucleotídico de manera muy rápida en el tiempo y dependiente de su activación de las ERK1/2. A tiempos más largos, el BzATP contribuye a la recuperación de la actividad DUSP6, efecto que dependería de la inducción a nivel transcripcional y que ayudaría a restablecer los niveles basales de DUSP6. En efecto, las preincubaciones realizadas con el BzATP de 2 horas previas a la exposición al cisplatino, estarían en el período de activación transcripcional de la DUSP6, y explicarían que el BzATP fuera capaz de recuperar parcialmente los niveles de la proteína DUSP6 horas después del tratamiento con este agente genotóxico.

Los mismos resultados se obtuvieron con el factor de crecimiento epidérmico, EGF, que se tomó como control positivo, como factor que activa la señalización de ERK1/2 y la expresión de la fosfatasa DUSP6 (Cooper y cols., 1982; Sarkozi y cols., 2007). Dentro de la señalización acoplada a EGFR, las proteínas ERK1/2 se sabe que juegan un papel predominante en distintos tipos celulares, así como en neuronas granulares, y también son bien conocidos sus efectos neuroprotectores. En las neuronas granulares expuestas al cisplatino, el EGF también producía desfosforilación de las ERK1/2. Las variaciones en los niveles de la proteína DUSP6 en presencia de EGF, guardaban un paralelismo muy claro con el patrón observado con el BzATP. Si bien, el EGF ya de por sí producía una activación más transitoria de las ERK1/2 que el BzATP, que probablemente estaba relacionada con una caída menos pronunciada de la proteína DUSP6. Lo que llamó la atención del efecto del EGF fue que en presencia del inhibidor del proteasoma, aumentaba los niveles de proteína DUSP6 de manera significativa, muy por encima del basal. Por tanto, el EGF sería más potente activando la transcripción de DUSP6 que el BzATP.

De acuerdo con eso, se analizó con detalle la transcripción del gen *dusp6* inducida por el agonista nucleotídico y por el factor de crecimiento. Aunque

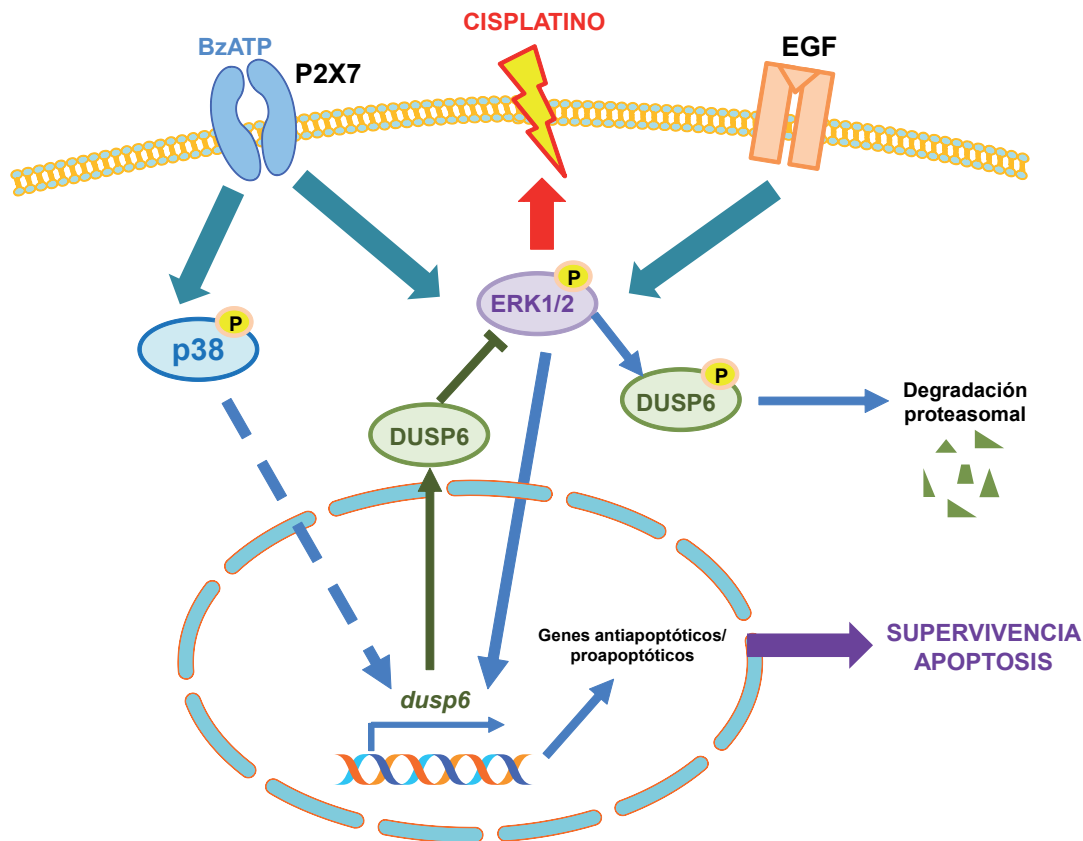


DUSP6 se expresa constitutivamente, en algunos tipos celulares también presenta un carácter inducible por factores de crecimiento, tales como el factor del crecimiento del nervio (Hashimoto y cols.) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Groom y cols., 1996; Camps y cols., 1998; Reffas y Schlegel, 2000). De acuerdo con esto, detectamos su inducción transcripcional a tiempos muy cortos en las neuronas granulares estimuladas con BzATP y EGF a partir de 30 min. Esto estaría en el mismo rango que lo descrito para el FGF, EGF y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), o incluso los ésteres de forbol, que sitúan el máximo o pico de expresión del mensajero entre 30 min a 1 hora de estimulación (Zeliadt y cols., 2008; Jurek y cols., 2009; Geetha y cols., 2011). Por otro lado, una diferencia importante entre BzATP y EGF se encontraba en la duración de sus efectos sobre la transcripción de *dusp6*, que caía rápidamente con el BzATP, y permanecía elevada hasta las 2 horas con el EGF. Esto explicaría el hecho de que el EGF fuera más eficiente promoviendo la expresión de la proteína DUSP6, que subía progresivamente a partir de las 2 horas en presencia del inhibidor MG-132.

Como se ha citado anteriormente, la expresión constitutiva de *dusp6* era dependiente de la actividad ERK1/2. Sin embargo, con el BzATP, en presencia del inhibidor U-0126 todavía se observaba incremento de los niveles de *dusp6* por encima del basal. Esto quiere decir que el receptor P2X7 estaría activando otras vías de señalización diferentes además de las ERK1/2, que serían responsables de su efecto sobre la transcripción de *dusp6*. Nos encontramos que vía era la activación de la p38-MAPK, puesto que el inhibidor selectivo SB212090, prevenía cualquier incremento de la transcripción de *dusp6* mediado por el BzATP. Además, el patrón de activación de la p38-MAPK por BzATP, cuyo máximo se encontraba a los 10 minutos, estaba de acuerdo con la rápida inducción del gen *dusp6* por el BzATP a los 30 minutos, mientras que no concordaba con el máximo de activación de las ERK1/2 más retrasado en el tiempo que producía el BzATP (1 hora). Asimismo, el hecho de que EGF y BzATP estuvieran activando la transcripción de *dusp6* a través de mecanismos de acción diferentes, dependientes de ERK1/2 y p38-MAPK, respectivamente, también explicaría el efecto aditivo observado entre el EGF y el BzATP sobre distintas acciones, la propia expresión de DUSP6, la desfosforilación de ERK1/2 y neuroprotección en condiciones de exposición al cisplatino.

Por tanto, todo lo expuesto se podría resumir en el esquema adjunto a continuación (Figura 58), en el que se describe el mecanismo de acción dual del

agonista nucleotídico y del factor de crecimiento sobre la estabilidad y expresión de la fosfatasa DUSP6 y su contribución al mantenimiento de la señalización de las ERK1/2.



**Figura 58. Participación del agonista nucleotídico P2X7 y del factor de crecimiento EGF en los mecanismos retroalimentación positivos y negativos que regulan la homeostasis de las ERK1/2.** La fosfatasa DUSP6 actúa en una ruta de retroalimentación negativa que modulando la fosforilación de ERK1/2. En una fase temprana, el BzATP o el EGF estimulan la fosforilación de DUSP6 dependiente de la activación de ERK1/2 llevándola posteriormente a su degradación por vía del proteasoma. En una fase más tardía, DUSP6 es sintetizada y conduce a la desfosforilación eficiente de las ERK1/2 y su desactivación.

Es interesante resaltar que el mecanismo de acción descrito para el agonista nucleotídico y el EGF en neuronas granulares opera de la misma manera para otros factores de crecimiento. Este es el caso del PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), que también presentaba una respuesta bifásica en la expresión de DUSP6, que se correlacionaba de manera inversa con la fosforilación de las ERK1/2 (Jurek y cols., 2009).

También existen ejemplos en la literatura acerca de cooperación de distintos factores en la expresión de DUSP6, como se ha descrito para BzATP y EGF. En otros modelos celulares como el de fibroblastos, se ha demostrado que la estimulación combinada del receptor de la lipoproteína de baja densidad 1 (LPR-



1) con el de EGF, presentan un efecto sinérgico en la activación de la expresión de DUSP1 y DUSP6 para disminuir los niveles de ERK1/2 fosforilado en el núcleo (Geetha y cols., 2011). En células endoteliales también se produce un sinergismo entre la trombina y el EGF sobre la inducción de DUSP1 (Chandrasekharan y cols., 2010). No obstante, no habría que descartar que el efecto aditivo observado entre BzATP y EGF pudiera deberse a un mecanismo de transactivación, como se ha demostrado en otros trabajos donde su interacción es imprescindible para poder inducir el factor de transcripción Egr-1 a través de la activación de ERK1/2 mediante la inhibición de la expresión de la fosfatasa DUSP1 (Stefano y cols., 2007). Por ello son necesarios experimentos adicionales para esclarecer del todo este mecanismo de cooperación.

#### **4. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DEL MANTENIMIENTO DE LA ACTIVIDAD DE LAS FOSFATASAS DE ESPECIFICIDAD DUAL EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR.**

Estos resultados ponen en manifiesto el papel fundamental que desempeña la actividad de las proteínas fosfatasas de especificidad dual como uno de los principales mecanismos que contribuyen a la regulación de las proteínas MAP quinasas. Este proceso de activación es esencial para prevenir la estimulación mantenida de estas rutas de señalización y permitir que las células puedan responder a estímulos posteriores que aseguren la adecuada respuesta fisiológica de las ERK1/2, p38 y JNK en plasticidad sináptica y supervivencia neuronal. En este sentido, las fosfatasas de especificidad dual controlan tanto la amplitud como la duración de la señal de los distintos tipos de MAP quinasas. Al ser un punto clave de control, el fallo o la deficiencia en la actividad de las DUSPs parecen contribuir de manera muy importante a la desregulación de la señal de las MAP quinasas. El déficit en los mecanismos de desfosforilación de las MAP quinasas es responsable de la activación crónica que se observa como consecuencia de la llegada de estímulos tóxicos o dañinos (Tamura y cols., 2002).

La regulación de estas fosfatasas, además, puede estar implicada en procesos relacionados con la edad o enfermedades neurodegenerativas en los que se ha visto que muchas vías de señalización, sobre todo las ERK1/2, están desreguladas. Asimismo, en una línea celular de hipocampo se ha observado la degradación de la DUSP1 durante la exposición a concentraciones tóxicas de glutamato (Choi y cols., 2005). Por otra parte, la inhibición transcripcional de las fosfatasas DUSP2 y DUSP6 pueden ser responsables o contribuir a la sobreactivación de MAP quinasas que se observa en respuesta a procesos como

la hipoxia, procesos inflamatorios, isquemia y cáncer (Lin y cols.; Wu y cols.; Bermudez y cols., 2010). Los ejemplos más numerosos los aportan las células tumorales, en las que se han descrito variaciones significativas en la expresión de estas fosfatasas, que están detrás de la desregulación de la señalización de las ERK1/2, es decir, del mantenimiento de la activación de las MAP quinasas que mantiene la respuesta proliferativa de las células tumorales y lo por tanto, una alteración de la expresión de las fosfatasas puede convertirse en factor importante provocando de ese modo que las células se conviertan resistentes a los tratamientos de quimioterapia con cisplatino (Bermudez y cols., 2010). Este es el caso de la disminución de la expresión de DUSP1 en próstata y tumores de colon, y de DUSP6 en cáncer de páncreas. En este mismo sentido, los ratones deficientes del gen *DUSP6*, presentan una mayor resistencia a tratamientos citotóxicos o quimioterápicos en los tumores de ovario.

Todos estos datos evidencian que hay una serie de proteínas fosfatasas de especificidad que son esenciales para la supervivencia celular. De acuerdo con ello, la recuperación de la actividad de las fosfatasas de especificidad dual es capaz de restaurar no solamente la homeostasis de la señal de las MAP quinasas, sino también de prevenir la muerte celular asociada al estrés genotóxico. En este sentido, está descrito que la sobreexpresión de DUSP1 y DUSP4 es capaz de proteger frente a la muerte por la exposición a la luz UV y cisplatino en fibroblastos y líneas celulares, de hecho, el silenciamiento del gen *dusp1* provoca una mayor sensibilidad y susceptibilidad a los efectos nocivos de la radiación UV (Staples y cols., 2010; Choi y cols., 2005; Cadalbert y cols, 2005). Por otra parte, en modelos neuronales, y más cercanos a lo descrito en neuronas granulares, la sobreexpresión de DUSP6 en neuronas corticales rescata de la muerte celular frente al glutamato tóxico (Levinthal y Defranco, 2005; Gozdz y cols., 2008), y la sobreexpresión de DUSP1 además protege frente a la retirada de factores de crecimiento nervioso, como el NGF en neuronas simpáticas (Kristiansen y cols.).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo apuntan en esta misma dirección. El restablecimiento de la expresión de DUSP2 y DUSP6 es inducida por la activación de los receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7, respectivamente, en las neuronas granulares, que podría explicar, no solamente la vuelta a los niveles normales de las MAP quinasas ERK1/2 y p38-MAPK, sino también, al menos en parte, la neuroprotección inducida por los agonistas nucleotídicos. En otros trabajos centrados en el estudio de la proliferación celular en células cancerígenas de colon y próstata, se ha demostrado que la estimulación con ATP favorece a la expresión

de DUSP1 disminuyendo de ese modo la división celular descontrolada (Chen y cols., 2004; Buzzi y cols., 2010).

Sería necesario realizar experimentos de sobreexpresión de los genes *dusp6* y *dusp2* para confirmar su papel en la supervivencia de las neuronas granulares. No obstante, el hecho de que los inhibidores de las tirosina fosfatasa, tanto el ortovanadato, como el BCI, ya comprometen de manera importante la supervivencia celular, y además, anulan por completo los efectos protectores ejercidos por los agonistas nucleotídicos, 2MeSADP y BzATP, frente a la apoptosis inducida por cisplatino y luz UV, ya está indicando la importancia que tiene el control adecuado de la duración e intensidad de la señalización de las MAP quinasas en la fisiología de las neuronas granulares.

Es necesario hacer constar que la activación de las ERK1/2 derivada de la señalización acoplada a estos receptores P2Y<sub>13</sub> y P2X7, juegan un papel primordial en la protección inducida por los nucleótidos frente al estrés genotóxico. En efecto, la inducción a nivel transcripcional de las fosfatasa DUSP2 y DUSP6, es dependiente de ERK1/2. Además, cuando se produce la inhibición de las ERK1/2, tampoco este efecto rescata de la muerte inducida por cisplatino o luz UV. Lo que nos está indicando que, si bien las ERK1/2 son sobreactivadas en respuesta al estrés genotóxico, se requiere de su actividad para iniciar una respuesta protectora, es decir que su sobreactivación tiene el objeto de activar mecanismos de defensa celular, como pueden ser la activación de las proteínas fosfatasa que restauren los niveles normales de activación de las cascadas de las MAP quinasas.

Por otro lado, la función de la activación de la proteína p38-MAPK por parte del receptor nucleotídico P2X7 parece ser esencial para su señalización y sus acciones neuroprotectoras, en el mismo grado que las ERK1/2. En efecto, la inactivación de cada una de estas MAP quinasas de manera independiente, con los inhibidores SB-212090 y U-0126, reducía parcialmente el efecto protector del BzATP frente a la apoptosis inducida por cisplatino, pero no lo bloqueaba por completo. De acuerdo con esto, la inhibición de la p38-MAPK con SB-202190, estaría impidiendo la restauración de la actividad DUSP6 dependiente de BzATP. Pero además, y según el mecanismo de regulación cruzada descrito anteriormente entre p38-MAPK y ERK1/2 a través de la PP2A, el bloqueo de p38-MAPK potenciaría la activación de las ERK1/2 y sus acciones protectoras. En sentido recíproco, después de la inhibición de la actividad de las ERK1/2 con el U-0126, todavía quedarían activadas otras vías de supervivencia importantes en las neuronas granulares, como son la vías dependientes de PI3K/Akt y GSK3 que

también son activadas por los receptores nucleotídicos P2Y<sub>13</sub> y P2X7.

Este trabajo pone de manifiesto que el papel fisiológico que juegan los nucleótidos en las neuronas granulares es esencialmente un papel neuroprotector. No solamente los receptores de nucleótidos están acoplados a las rutas de señalización principales que median supervivencia celular, sino que también están acoplados a los mecanismos de retroalimentación que aseguran el correcto funcionamiento de estas vías, completando con ello un ciclo esencial para asegurar la homeostasis celular.

Finalmente, como conclusión general, esta Tesis Doctoral ha demostrado por primera vez el acoplamiento de receptores purinérgicos a la expresión de fosfatasa de especificidad dual en un modelo neuronal, gracias al cual contribuyen al mantenimiento de la homeostasis de la señalización de las MAP quinasas. También se demuestra la relevancia de los procesos reguladores de retroalimentación negativa y de cómo ejercen su influencia sobre las respuestas celulares, siendo estos mecanismos dianas muy importantes en la regulación y en la supervivencia celular.



*Conclusiones*







1. Los estímulos de tipo genotóxico en neuronas granulares de cerebelo, como la exposición a la luz UV, camptotecina o cisplatino, provocan una sobre-activación mantenida en el tiempo de las proteínas de la familia de las MAP quinasas, como consecuencia de defectos en la expresión de proteínas fosfatasas de especificidad dual, DUSPs.

2. La activación de los receptores nucleotídicos P2Y<sub>13</sub> y P2X7 restaura la señalización basal de las MAP quinasas y protege frente a la muerte por apoptosis inducida como por la exposición a los estímulos genotóxicos.

3. El receptor P2Y<sub>13</sub> está acoplado a la expresión de la fosfatasa de especificidad dual de tipo inducible, DUSP2, a través de su señalización dependiente de ERK1/2. Mediante este mecanismo se restaura la actividad de DUSP2 revirtiendo la sobre-fosforilación de la p38-MAPK en el núcleo.

4. El receptor P2X7 y el receptor de EGF regulan de manera bifásica los niveles de la fosfatasa de especificidad dual constitutiva, DUSP6. En una primera etapa, la activación transitoria de las ERK1/2 mediada por ambos receptores conduce a la fosforilación y degradación de DUSP6. En una segunda etapa, inducen la expresión transcripcional de DUSP6 para terminar la señalización de ERK1/2.

5. El receptor P2X7 está acoplado a la activación transitoria de la p38-MAPK, que es esencial para su efecto neuroprotector y para su efecto sobre la inducción transcripcional de la DUSP6.

6. La acción reguladora de los receptores nucleotídicos P2Y<sub>13</sub> y P2X7 sobre la expresión de las fosfatasas DUSP2 y DUSP6 está implicada en el efecto neuroprotector frente a la exposición de agentes inductores de daño al ADN en neuronas granulares de cerebelo.



## *Bibliografía*





- Abbracchio, M. P., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M. T., King, B. F., Gachet, C., Jacobson, K. A., Weisman, G. A. and Burnstock, G. (2003). "Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y<sub>14</sub> receptor) adds diversity to the P2Y receptor family." *Trends Pharmacol Sci* **24**(2): 52-55.
- Abbracchio, M. P. and Burnstock, G. (1994). "Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?" *Pharmacol Ther* **64**(3): 445-475.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J. M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A. and Weisman, G. A. (2006). "International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy." *Pharmacol Rev* **58**(3): 281-341.
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. and Zimmermann, H. (2009). "Purinergic signalling in the nervous system: an overview." *Trends Neurosci* **32**(1): 19-29.
- Aga, M., Johnson, C. J., Hart, A. P., Guadarrama, A. G., Suresh, M., Svaren, J., Bertics, P. J. and Darien, B. J. (2002). "Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X<sub>7</sub>." *J Leukoc Biol* **72**(1): 222-232.
- Alekseeva, N., Kablinger, A. S., Pinkston, J., Gonzalez-Toledo, E. C. and Minagar, A. (2005). "Hereditary ataxia and behavior." *Adv Neurol* **96**: 275-283.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. and Mustelin, T. (2004). "Protein tyrosine phosphatases in the human genome." *Cell* **117**(6): 699-711.
- Allen, M. T., Myers, C. E. and Gluck, M. A. (2001). "Parallel neural systems for classical conditioning: support from computational modeling." *Integr Physiol Behav Sci* **36**(1): 36-61.
- Alloisio, S., Cervetto, C., Passalacqua, M., Barbieri, R., Maura, G., Nobile, M. and Marcoli, M. (2008). "Functional evidence for presynaptic P2X<sub>7</sub> receptors in adult rat cerebrocortical nerve terminals." *FEBS Lett* **582**(28): 3948-3953.
- Amisten, S., Meidute-Abaraviciene, S., Tan, C., Olde, B., Lundquist, I., Salehi, A. and Erlinge, D. (2010). "ADP mediates inhibition of insulin secretion by activation of P2Y<sub>13</sub> receptors in mice." *Diabetologia* **53**(9): 1927-1934.
- Arbeloa, J., Perez-Samartin, A., Gottlieb, M. and Matute, C. (2012). "P2X<sub>7</sub> receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in neurons and reduces brain damage after ischemia." *Neurobiol Dis* **45**(3): 954-961.

- Aschrafi, A., Sadtler, S., Niculescu, C., Rettinger, J. and Schmalzing, G. (2004). "Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes." *J Mol Biol* **342**(1): 333-343.
- Ashwell, J. D. (2006). "The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system." *Nat Rev Immunol* **6**(7): 532-540.
- Athias, M. (1897). "Recherches sur l'histogénèse de l'écorce du cervelet." *J. Anat. Physiol* **33**: 372-404.
- Atkins, C. M., Falo, M. C., Alonso, O. F., Bramlett, H. M. and Dietrich, W. D. (2009). "Deficits in ERK and CREB activation in the hippocampus after traumatic brain injury." *Neurosci Lett* **459**(2): 52-56.
- Atkinson, L., Batten, T. F., Moores, T. S., Varoqui, H., Erickson, J. D. and Deuchars, J. (2004). "Differential co-localisation of the P2X7 receptor subunit with vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in rat CNS." *Neuroscience* **123**(3): 761-768.
- Avruch, J., Zhang, X. F. and Kyriakis, J. M. (1994). "Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway." *Trends Biochem Sci* **19**(7): 279-283.
- Ayyanathan, K., Webbs, T. E., Sandhu, A. K., Athwal, R. S., Barnard, E. A. and Kunapuli, S. P. (1996). "Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor." *Biochem Biophys Res Commun* **218**(3): 783-788.
- Bachelor, M. A. and Bowden, G. T. (2004). "Ultraviolet A-induced modulation of Bcl-XL by p38 MAPK in human keratinocytes: post-transcriptional regulation through the 3'-untranslated region." *J Biol Chem* **279**(41): 42658-42668.
- Bahima, L., Aleu, J., Elias, M., Martin-Satue, M., Muhaisen, A., Blasi, J., Marsal, J. and Solsona, C. (2006). "Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes." *J Cell Physiol* **206**(1): 95-102.
- Balazs, R., Gallo, V. and Kingsbury, A. (1988). "Effect of depolarization on the maturation of cerebellar granule cells in culture." *Brain Res* **468**(2): 269-276.
- Barden, N., Harvey, M., Gagne, B., Shink, E., Tremblay, M., Raymond, C., Labbe, M., Villeneuve, A., Rochette, D., Bordeleau, L., Stadler, H., Holsboer, F. and Muller-Myhsok, B. (2006). "Analysis of single nucleotide polymorphisms in genes in the chromosome 12Q24.31 region points to P2RX7 as a susceptibility gene to bipolar affective disorder." *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **141B**(4): 374-382.
- Barrera, N. P., Ormond, S. J., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado, R. D. and Edwardson, J. M. (2005). "Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize." *J Biol Chem* **280**(11): 10759-10765.

- Barth, K., Weinhold, K., Guenther, A., Young, M. T., Schnittler, H. and Kasper, M. (2007). "Caveolin-1 influences P2X7 receptor expression and localization in mouse lung alveolar epithelial cells." *FEBS J* **274**(12): 3021-3033.
- Becker, D., Woltersdorf, R., Boldt, W., Schmitz, S., Braam, U., Schmalzing, G. and Markwardt, F. (2008). "The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity." *J Biol Chem* **283**(37): 25725-25734.
- Belcher, S. M., Le, H. H., Spurling, L. and Wong, J. K. (2005). "Rapid estrogenic regulation of extracellular signal- regulated kinase 1/2 signaling in cerebellar granule cells involves a G protein- and protein kinase A-dependent mechanism and intracellular activation of protein phosphatase 2A." *Endocrinology* **146**(12): 5397-5406.
- Bermudez, O., Pages, G. and Gimond, C. (2010). "The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer." *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(2): C189-202.
- Bernocchi, G., Bottone, M. G., Piccolini, V. M., Dal Bo, V., Santin, G., De Pascali, S. A., Migoni, D. and Fanizzi, F. P. (2011). "Developing central nervous system and vulnerability to platinum compounds." *Chemother Res Pract* **2011**: 315418.
- Bianchi, B. R., Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E. C., Alexander, K. M., Park, H. S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., Jarvis, M. F. and van Biesen, T. (1999). "Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes." *Eur J Pharmacol* **376**(1-2): 127-138.
- Bigonnesse, F., Levesque, S. A., Kukulski, F., Lecka, J., Robson, S. C., Fernandes, M. J. and Seigny, J. (2004). "Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8." *Biochemistry* **43**(18): 5511-5519.
- Blanks, R. H. (1988). "Cerebellum." *Rev Oculomot Res* **2**: 225-272.
- Bloethner, S., Chen, B., Hemminki, K., Muller-Berghaus, J., Ugurel, S., Schadendorf, D. and Kumar, R. (2005). "Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines." *Carcinogenesis* **26**(7): 1224-1232.
- Bo, X., Jiang, L. H., Wilson, H. L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A. and North, R. A. (2003). "Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1407-1416.
- Bodin, P. and Burnstock, G. (2001). "Purinergic signalling: ATP release." *Neurochem Res* **26**(8-9): 959-969.
- Bogdanov, Y. D., Dale, L., King, B. F., Whittock, N. and Burnstock, G. (1997). "Early expression of a novel nucleotide receptor in the neural plate of Xenopus embryos." *J Biol Chem* **272**(19): 12583-12590.



- Boschert, U., Muda, M., Camps, M., Dickinson, R. and Arkininstall, S. (1997). "Induction of the dual specificity phosphatase PAC1 in rat brain following seizure activity." Neuroreport 8(14): 3077-3080.
- Botia, B., Basille, M., Allais, A., Raoult, E., Falluel-Morel, A., Galas, L., Jolivel, V., Wurtz, O., Komuro, H., Fournier, A., Vaudry, H., Burel, D., Gonzalez, B. J. and Vaudry, D. (2007). "Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex." Peptides 28(9): 1746-1752.
- Bottone, M. G., Veronica, D. B., Piccolini, V. M., Bottiroli, G., De Pascali, S. A., Fanizzi, F. P. and Bernocchi, G. (2012). "Developmental expression of cellular prion protein and apoptotic molecules in the rat cerebellum: effects of platinum compounds." J Chem Neuroanat 46(1-2): 19-29.
- Boue-Grabot, E., Archambault, V. and Seguela, P. (2000). "A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels." J Biol Chem 275(14): 10190-10195.
- Boutros, T., Chevet, E. and Metrakos, P. (2008). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer." Pharmacol Rev 60(3): 261-310.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
- Brancho, D., Tanaka, N., Jaeschke, A., Ventura, J. J., Kelkar, N., Tanaka, Y., Kyuuma, M., Takeshita, T., Flavell, R. A. and Davis, R. J. (2003). "Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo." Genes Dev 17(16): 1969-1978.
- Brinson, A. E. and Harden, T. K. (2001). "Differential regulation of the uridine nucleotide-activated P2Y4 and P2Y6 receptors. SER-333 and SER-334 in the carboxyl terminus are involved in agonist-dependent phosphorylation desensitization and internalization of the P2Y4 receptor." J Biol Chem 276(15): 11939-11948.
- Brondello, J. M., Brunet, A., Pouyssegur, J. and McKenzie, F. R. (1997). "The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade." J Biol Chem 272(2): 1368-1376.
- Brozovic, A., Fritz, G., Christmann, M., Zisowsky, J., Jaehde, U., Osmak, M. and Kaina, B. (2004). "Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance." Int J Cancer 112(6): 974-985.
- Brozovic, A. and Osmak, M. (2007). "Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance." Cancer Lett 251(1): 1-16.

- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S. and Pouyssegur, J. (1999). "Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry." EMBO J 18(3): 664-674.
- Buell, G. N., Talabot, F., Gos, A., Lorenz, J., Lai, E., Morris, M. A. and Antonarakis, S. E. (1998). "Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor." Receptors Channels 5(6): 347-354.
- Buettner, R., Papoutsoglou, G., Scemes, E., Spray, D. C. and Dermietzel, R. (2000). "Evidence for secretory pathway localization of a voltage-dependent anion channel isoform." Proc Natl Acad Sci U S A 97(7): 3201-3206.
- Buisman, H. P., Steinberg, T. H., Fischbarg, J., Silverstein, S. C., Vogelzang, S. A., Ince, C., Ypey, D. L. and Leijh, P. C. (1988). "Extracellular ATP induces a large nonselective conductance in macrophage plasma membranes." Proc Natl Acad Sci U S A 85(21): 7988-7992.
- Burnstock, G. (1997). "The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules." Neuropharmacology 36(9): 1127-1139.
- Burnstock, G. (2007a). "Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission." Physiol Rev 87(2): 659-797.
- Burnstock, G. (2007b). "Purine and pyrimidine receptors." Cell Mol Life Sci 64(12): 1471-1483.
- Burnstock, G. (2008). "Purinergic signalling and disorders of the central nervous system." Nat Rev Drug Discov 7(7): 575-590.
- Burnstock, G. (2013). "Introduction to purinergic signalling in the brain." Adv Exp Med Biol 986: 1-12.
- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D. and Smythe, A. (1970). "Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut." Br J Pharmacol 40(4): 668-688.
- Burnstock, G., Dumsday, B. and Smythe, A. (1972). "Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide." Br J Pharmacol 44(3): 451-461.
- Burnstock, G. and Knight, G. E. (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." Int Rev Cytol 240: 31-304.
- Burnstock, G., Knight, G. E. and Greig, A. V. (2012). "Purinergic signaling in healthy

- and diseased skin." *J Invest Dermatol* **132**(3 Pt 1): 526-546.
- Buzzi, N., Boland, R. and Russo de Boland, A. (2010). "Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells." *Biochim Biophys Acta* **1800**(9): 946-955.
- Cabrini, G., Falzoni, S., Forchap, S. L., Pellegatti, P., Balboni, A., Agostini, P., Cuneo, A., Castoldi, G., Baricordi, O. R. and Di Virgilio, F. (2005). "A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes." *J Immunol* **175**(1): 82-89.
- Cadalbert, L., Sloss, C. M., Cameron, P. and Plevin, R. (2005). "Conditional expression of MAP kinase phosphatase-2 protects against genotoxic stress-induced apoptosis by binding and selective dephosphorylation of nuclear activated c-jun N-terminal kinase." *Cell Signal* **17**(10): 1254-1264.
- Cadet, J., Douki, T., Pouget, J. P., Ravanat, J. L. and Sauvaigo, S. (2001). "Effects of UV and visible radiations on cellular DNA." *Curr Probl Dermatol* **29**: 62-73.
- Camps, M., Chabert, C., Muda, M., Boschert, U., Gillieron, C. and Arkinstall, S. (1998a). "Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12." *FEBS Lett* **425**(2): 271-276.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U. and Arkinstall, S. (1998b). "Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase." *Science* **280**(5367): 1262-1265.
- Carrasquero, L. M., Delicado, E. G., Bustillo, D., Gutierrez-Martin, Y., Artalejo, A. R. and Miras-Portugal, M. T. (2009). "P2X7 and P2Y13 purinergic receptors mediate intracellular calcium responses to BzATP in rat cerebellar astrocytes." *J Neurochem* **110**(3): 879-889.
- Carrasquero, L. M., Delicado, E. G., Jimenez, A. I., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2005). "Cerebellar astrocytes co-express several ADP receptors. Presence of functional P2Y(13)-like receptors." *Purinergic Signal* **1**(2): 153-159.
- Carrasquero, L. M., Delicado, E. G., Sanchez-Ruiloba, L., Iglesias, T. and Miras-Portugal, M. T. (2010). "Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes." *Glia*.
- Caunt, C. J., Rivers, C. A., Conway-Campbell, B. L., Norman, M. R. and McArdle, C. A. (2008). "Epidermal growth factor receptor and protein kinase C signaling to ERK2: spatiotemporal regulation of ERK2 by dual specificity phosphatases." *J Biol Chem* **283**(10): 6241-6252.
- Cerri, S., Piccolini, V. M., Santin, G., Bottone, M. G., De Pascali, S. A., Migoni, D., Iadarola, P., Fanizzi, F. P. and Bernocchi, G. (2011). "The developmental

- neurotoxicity study of platinum compounds. Effects of cisplatin versus a novel Pt(II) complex on rat cerebellum." Neurotoxicol Teratol **33**(2): 273-281.
- Ciana, P., Fumagalli, M., Trincavelli, M. L., Verderio, C., Rosa, P., Lecca, D., Ferrario, S., Parravicini, C., Capra, V., Gelosa, P., Guerrini, U., Belcredito, S., Cimino, M., Sironi, L., Tremoli, E., Rovati, G. E., Martini, C. and Abbracchio, M. P. (2006). "The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor." EMBO J **25**(19): 4615-4627.
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J. and Spedding, M. (2009). "A nomenclature for ligand-gated ion channels." Neuropharmacology **56**(1): 2-5.
- Collo, G., Neidhart, S., Kawashima, E., Kosco-Vilbois, M., North, R. A. and Buell, G. (1997). "Tissue distribution of the P2X7 receptor." Neuropharmacology **36**(9): 1277-1283.
- Communi, D., Gonzalez, N. S., Detheux, M., Brezillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (2001). "Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i)." J Biol Chem **276**(44): 41479-41485.
- Communi, D., Govaerts, C., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (1997). "Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase." J Biol Chem **272**(51): 31969-31973.
- Communi, D., Motte, S., Boeynaems, J. M. and Piroton, S. (1996). "Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor." Eur J Pharmacol **317**(2-3): 383-389.
- Communi, D., Piroton, S., Parmentier, M. and Boeynaems, J. M. (1995). "Cloning and functional expression of a human uridine nucleotide receptor." J Biol Chem **270**(52): 30849-30852.
- Contestabile, A. (2002). "Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro." Cerebellum **1**(1): 41-55.
- Cooper, J. A., Bowen-Pope, D. F., Raines, E., Ross, R. and Hunter, T. (1982). "Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins." Cell **31**(1): 263-273.
- Correa, S. A. and Eales, K. L. (2012). "The Role of p38 MAPK and Its Substrates in Neuronal Plasticity and Neurodegenerative Disease." J Signal Transduct **2012**: 649079.
- Costanzi, S., Mamedova, L., Gao, Z. G. and Jacobson, K. A. (2004). "Architecture of P2Y nucleotide receptors: structural comparison based on sequence analysis, mutagenesis, and homology modeling." J Med Chem **47**(22): 5393-5404.

- Cuadrado, A. and Nebreda, A. R. (2010). "Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling." *Biochem J* **429**(3): 403-417.
- Cuenda, A. and Rousseau, S. (2007). "p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1358-1375.
- Cui, W., Yazlovitskaya, E. M., Mayo, M. S., Pelling, J. C. and Persons, D. L. (2000). "Cisplatin-induced response of c-jun N-terminal kinase 1 and extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in a series of cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell lines." *Mol Carcinog* **29**(4): 219-228.
- Chambers, J. K., Macdonald, L. E., Sarau, H. M., Ames, R. S., Freeman, K., Foley, J. J., Zhu, Y., McLaughlin, M. M., Murdock, P., McMillan, L., Trill, J., Swift, A., Aiyar, N., Taylor, P., Vawter, L., Naheed, S., Szekeres, P., Hervieu, G., Scott, C., Watson, J. M., Murphy, A. J., Duzic, E., Klein, C., Bergsma, D. J., Wilson, S. and Livi, G. P. (2000). "A G protein-coupled receptor for UDP-glucose." *J Biol Chem* **275**(15): 10767-10771.
- Chambers, L. J., Stevens, A. J., Moses, A. P., Michel, A. D., Walter, D. S., Davies, D. J., Livermore, D. G., Fonfria, E., Demont, E. H., Vimal, M., Theobald, P. J., Beswick, P. J., Gleave, R. J., Roman, S. A. and Senger, S. (2010). "Synthesis and structure-activity relationships of a series of (1H-pyrazol-4-yl)acetamide antagonists of the P2X(7) receptor." *Bioorg Med Chem Lett*.
- Chan, D. W., Liu, V. W., Tsao, G. S., Yao, K. M., Furukawa, T., Chan, K. K. and Ngan, H. Y. (2008). "Loss of MKP3 mediated by oxidative stress enhances tumorigenicity and chemoresistance of ovarian cancer cells." *Carcinogenesis* **29**(9): 1742-1750.
- Chandrasekharan, U. M., Waitkus, M., Kinney, C. M., Walters-Stewart, A. and DiCorleto, P. E. (2010). "Synergistic induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by thrombin and epidermal growth factor requires vascular endothelial growth factor receptor-2." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(10): 1983-1989.
- Chang, K., Hanaoka, K., Kumada, M. and Takuwa, Y. (1995). "Molecular cloning and functional analysis of a novel P2 nucleotide receptor." *J Biol Chem* **270**(44): 26152-26158.
- Chang, L. and Karin, M. (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* **410**(6824): 37-40.
- Chatterjee, C. and Sparks, D. L. (2012). "Extracellular nucleotides inhibit insulin receptor signaling, stimulate autophagy and control lipoprotein secretion." *PLoS One* **7**(5): e36916.
- Chedotal, A. (2010). "Should I stay or should I go? Becoming a granule cell." *Trends Neurosci* **33**(4): 163-172.



- Cheewatrakoolpong, B., Gilchrest, H., Anthes, J. C. and Greenfeder, S. (2005).** "Identification and characterization **Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G. and Wood, J. N. (1995).** "A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons." *Nature* **377**(6548): 428-431.
- Chen, L., He, H. Y., Li, H. M., Zheng, J., Heng, W. J., You, J. F. and Fang, W. G. (2004).** "ERK1/2 and p38 pathways are required for P2Y receptor-mediated prostate cancer invasion." *Cancer Lett* **215**(2): 239-247.
- Chen, X., Lan, X., Mo, S., Qin, J., Li, W., Liu, P., Han, Y. and Pi, R. (2009).** "p38 and ERK, but not JNK, are involved in copper-induced apoptosis in cultured cerebellar granule neurons." *Biochem Biophys Res Commun* **379**(4): 944-948.
- Chen, X., Pierce, B., Naing, W., Grapperhaus, M. L. and Phillion, D. P. (2010).** "Discovery of 2-chloro-N-((4,4-difluoro-1-hydroxycyclohexyl)methyl)-5-(5-fluoropyrimidin-2-yl)benzamide as a potent and CNS penetrable P2X(7) receptor antagonist." *Bioorg Med Chem Lett*.
- Chen, Y. R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. J. and Tan, T. H. (1996).** "The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation." *J Biol Chem* **271**(50): 31929-31936.
- Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W. L., Grahames, C. B., Casula, M. A., Yiangou, Y., Birch, R., Anand, P. and Buell, G. N. (2005).** "Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain." *Pain* **114**(3): 386-396.
- Chi, H., Barry, S. P., Roth, R. J., Wu, J. J., Jones, E. A., Bennett, A. M. and Flavell, R. A. (2006).** "Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2274-2279.
- Chi, H. and Flavell, R. A. (2008).** "Acetylation of MKP-1 and the control of inflammation." *Sci Signal* **1**(41): pe44.
- Chiarugi, P. and Cirri, P. (2003).** "Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction." *Trends Biochem Sci* **28**(9): 509-514.
- Chitale, D., Gong, Y., Taylor, B. S., Broderick, S., Brennan, C., Somwar, R., Golas, B., Wang, L., Motoi, N., Szoke, J., Reinersman, J. M., Major, J., Sander, C., Seshan, V. E., Zakowski, M. F., Rusch, V., Pao, W., Gerald, W. and Ladanyi, M. (2009).** "An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors." *Oncogene* **28**(31): 2773-2783.

- Cho, U. S. and Xu, W.** (2007). "Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme." *Nature* **445**(7123): 53-57.
- Choi, B. H., Hur, E. M., Lee, J. H., Jun, D. J. and Kim, K. T.** (2006). "Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death." *J Cell Sci* **119**(Pt 7): 1329-1340.
- Choi, R. C., Simon, J., Tsim, K. W. and Barnard, E. A.** (2008). "Constitutive and agonist-induced dimerizations of the P2Y1 receptor: relationship to internalization and scaffolding." *J Biol Chem* **283**(16): 11050-11063.
- Chouinard, N., Valerie, K., Rouabhia, M. and Huot, J.** (2002). "UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53." *Biochem J* **365**(Pt 1): 133-145.
- Chu, B., Soncin, F., Price, B. D., Stevenson, M. A. and Calderwood, S. K.** (1996a). "Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1." *J Biol Chem* **271**(48): 30847-30857.
- Chu, Y., Solski, P. A., Khosravi-Far, R., Der, C. J. and Kelly, K.** (1996b). "The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation." *J Biol Chem* **271**(11): 6497-6501.
- D'Ambrosi, N., Iafrate, M., Saba, E., Rosa, P. and Volonte, C.** (2007). "Comparative analysis of P2Y4 and P2Y6 receptor architecture in native and transfected neuronal systems." *Biochim Biophys Acta* **1768**(6): 1592-1599.
- D'Ambrosi, N., Iafrate, M., Vacca, F., Amadio, S., Tozzi, A., Mercuri, N. B. and Volonte, C.** (2006). "The P2Y(4) receptor forms homo-oligomeric complexes in several CNS and PNS neuronal cells." *Purinergic Signal* **2**(4): 575-582.
- D'Angelo, E.** (2011). "The cerebellar network: revisiting the critical issues." *J Physiol* **589**(Pt 14): 3421-3422.
- Davis, R. J.** (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." *Cell* **103**(2): 239-252.
- De Zeeuw, C., Simpsom, C., Hoogenraad, N., Galjart, N., Koekkoek, S., Ruigrok, T.** (1998). "Microcircuitry and function of the inferior olive." *TINS* **29**: 391-400.
- del Puerto, A., Diaz-Hernandez, J. I., Tapia, M., Gomez-Villafuertes, R., Benitez, M. J., Zhang, J., Miras-Portugal, M. T., Wandosell, F., Diaz-Hernandez, M. and Garrido, J. J.** (2012). "Adenylate cyclase 5 coordinates the action of ADP, P2Y1, P2Y13 and ATP-gated P2X7 receptors on axonal elongation." *J Cell Sci* **125**(Pt 1):



176-188.

- Delgado-Escueta, A. V.** (2007). "Advances in lafora progressive myoclonus epilepsy." Curr Neurol Neurosci Rep 7(5): 428-433.
- Delicado, E. G., Jimenez, A. I., Carrasquero, L. M., Castro, E. and Miras-Portugal, M. T.** (2005). "Cross-talk among epidermal growth factor, Ap(5)A, and nucleotide receptors causing enhanced ATP Ca(2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes." J Neurosci Res 81(6): 789-796.
- Denlinger, L. C., Coursin, D. B., Schell, K., Angelini, G., Green, D. N., Guadarrama, A. G., Halsey, J., Prabhu, U., Hogan, K. J. and Bertics, P. J.** (2006). "Human P2X7 pore function predicts allele linkage disequilibrium." Clin Chem 52(6): 995-1004.
- Denlinger, L. C., Sommer, J. A., Parker, K., Gudipaty, L., Fisette, P. L., Watters, J. W., Proctor, R. A., Dubyak, G. R. and Bertics, P. J.** (2003). "Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function." J Immunol 171(3): 1304-1311.
- Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A. and Dixon, J. E.** (1996). "Form and function in protein dephosphorylation." Cell 87(3): 361-364.
- Di Virgilio, F.** (1995). "The P2Z purinoceptor: an intriguing role in immunity, inflammation and cell death." Immunol Today 16(11): 524-528.
- Di Virgilio, F.** (2007). "Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome." Trends Pharmacol Sci 28(9): 465-472.
- Diaz-Hernandez, J. I., Gomez-Villafuertes, R., Leon-Otegui, M., Hontecillas-Prieto, L., Del Puerto, A., Trejo, J. L., Lucas, J. J., Garrido, J. J., Gualix, J., Miras-Portugal, M. T. and Diaz-Hernandez, M.** (2012). "In vivo P2X7 inhibition reduces amyloid plaques in Alzheimer's disease through GSK3beta and secretases." Neurobiol Aging 33(8): 1816-1828.
- Diaz-Hernandez, M., del Puerto, A., Diaz-Hernandez, J. I., Diez-Zaera, M., Lucas, J. J., Garrido, J. J. and Miras-Portugal, M. T.** (2008). "Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons." J Cell Sci 121(Pt 22): 3717-3728.
- Diaz-Hernandez, M., Diez-Zaera, M., Sanchez-Nogueiro, J., Gomez-Villafuertes, R., Canals, J. M., Alberch, J., Miras-Portugal, M. T. and Lucas, J. J.** (2009). "Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration." FASEB J.
- Diaz-Hernandez, M., Pereira, M. F., Pintor, J., Cunha, R. A., Ribeiro, J. A. and Miras-Portugal, M. T.** (2002a). "Modulation of the rat hippocampal dinucleotide receptor by adenosine receptor activation." J Pharmacol Exp Ther 301(2): 441-450.

- Díaz-Hernández, M., Pintor, J., Castro, E. and Miras-Portugal, M. T. (2001). "Independent receptors for diadenosine pentaphosphate and ATP in rat midbrain single synaptic terminals." *Eur J Neurosci* **14**(6): 918-926.
- Díaz-Hernández, M., Pintor, J., Castro, E. and Miras-Portugal, M. T. (2002b). "Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals." *Neuropharmacology* **42**(1): 20-33.
- Díaz-Hernández, M., Pintor, J. and Miras-Portugal, M. T. (2000). "Modulation of the dinucleotide receptor present in rat midbrain synaptosomes by adenosine and ATP." *Br J Pharmacol* **130**(2): 434-440.
- Díaz-Hernández, M., Sánchez-Nogueiro, J. and Miras-Portugal, M. T. (2006). "Role of CaMKII in the cross talk between ionotropic nucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals." *J Mol Neurosci* **30**(1-2): 177-180.
- Díaz-Hernández, M., Sánchez-Nogueiro, J., Pintor, J. and Miras-Portugal, M. T. (2004). "Interaction between dinucleotide and nicotinic receptors in individual cholinergic terminals." *J Pharmacol Exp Ther* **311**(3): 954-967.
- Dickinson, R. J. and Keyse, S. M. (2006). "Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases." *J Cell Sci* **119**(Pt 22): 4607-4615.
- Ding, Z., Kim, S., Dorsam, R. T., Jin, J. and Kunapuli, S. P. (2003). "Inactivation of the human P2Y<sub>12</sub> receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270." *Blood* **101**(10): 3908-3914.
- Donnelly-Roberts, D. L., Namovic, M. T., Faltynek, C. R. and Jarvis, M. F. (2004). "Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X<sub>7</sub> receptor (P2X<sub>7</sub>R)-induced pore formation in human THP-1 cells." *J Pharmacol Exp Ther* **308**(3): 1053-1061.
- Dranoff, J. A., O'Neill, A. F., Franco, A. M., Cai, S. Y., Connolly, G. C., Ballatori, N., Boyer, J. L. and Nathanson, M. H. (2000). "A primitive ATP receptor from the little skate *Raja erinacea*." *J Biol Chem* **275**(39): 30701-30706.
- Drury, A. N. and Szent-Györgyi, A. (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." *J Physiol* **68**(3): 213-237.
- Du, Y., Bales, K. R., Dodel, R. C., Hamilton-Byrd, E., Horn, J. W., Czilli, D. L., Simmons, L. K., Ni, B. and Paul, S. M. (1997). "Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21): 11657-11662.
- Dubyak, G. R. and el-Moatassim, C. (1993). "Signal transduction via P<sub>2</sub>-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides." *Am J Physiol* **265**(3 Pt 1):

C577-606.

- Ecke, D., Hanck, T., Tulapurkar, M. E., Schafer, R., Kassack, M., Stricker, R. and Reiser, G. (2008). "Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor." Biochem J 409(1): 107-116.
- Edwards, F. A., Gibb, A. J. and Colquhoun, D. (1992). "ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system." Nature 359(6391): 144-147.
- Ekerot, M., Stavridis, M. P., Delavaine, L., Mitchell, M. P., Staples, C., Owens, D. M., Keenan, I. D., Dickinson, R. J., Storey, K. G. and Keyse, S. M. (2008). "Negative-feedback regulation of FGF signalling by DUSP6/MKP-3 is driven by ERK1/2 and mediated by Ets factor binding to a conserved site within the DUSP6/MKP-3 gene promoter." Biochem J 412(2): 287-298.
- Eltzschig, H. K., Eckle, T., Mager, A., Kuper, N., Karcher, C., Weissmuller, T., Boengler, K., Schulz, R., Robson, S. C. and Colgan, S. P. (2006). "ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function." Circ Res 99(10): 1100-1108.
- Engel, T., Jimenez-Pacheco, A., Miras-Portugal, M. T., Diaz-Hernandez, M. and Henshall, D. C. (2012). "P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control." Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol 4(4): 174-187.
- Ennion, S. J. and Evans, R. J. (2002). "Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface." Mol Pharmacol 61(2): 303-311.
- Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I. and Weisman, G. A. (2006). "P2 receptors: intracellular signaling." Pflugers Arch 452(5): 552-562.
- Espada, S., Ortega, F., Molina-Jijon, E., Rojo, A. I., Perez-Sen, R., Pedraza-Chaverri, J., Miras-Portugal, M. T. and Cuadrado, A. (2010). "The purinergic P2Y(13) receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death." Free Radic Biol Med 49(3): 416-426.
- Exner, C., Weniger, G. and Irle, E. (2004). "Cerebellar lesions in the PICA but not SCA territory impair cognition." Neurology 63(11): 2132-2135.
- Fabre, A. C., Malaval, C., Ben Addi, A., Verdier, C., Pons, V., Serhan, N., Lichtenstein, L., Combes, G., Huby, T., Briand, F., Collet, X., Nijstad, N., Tietge, U. J., Robaye, B., Perret, B., Boeynaems, J. M. and Martinez, L. O. (2010). "P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport." Hepatology 52(4): 1477-1483.
- Farooq, A. and Zhou, M. M. (2004). "Structure and regulation of MAPK phosphatases."

Cell Signal 16(7): 769-779.

Fatemi, S. H., Aldinger, K. A., Ashwood, P., Bauman, M. L., Blaha, C. D., Blatt, G. J., Chauhan, A., Chauhan, V., Dager, S. R., Dickson, P. E., Estes, A. M., Goldowitz, D., Heck, D. H., Kemper, T. L., King, B. H., Martin, L. A., Millen, K. J., Mittleman, G., Mosconi, M. W., Persico, A. M., Sweeney, J. A., Webb, S. J. and Welsh, J. P. (2012). "Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism." Cerebellum 11(3): 777-807.

Feng, Y. H., Li, X., Wang, L., Zhou, L. and Gorodeski, G. I. (2006). "A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization." J Biol Chem 281(25): 17228-17237.

Feng, Y. H., Wang, L., Wang, Q., Li, X., Zeng, R. and Gorodeski, G. I. (2005). "ATP stimulates GRK-3 phosphorylation and beta-arrestin-2-dependent internalization of P2X7 receptor." Am J Physiol Cell Physiol 288(6): C1342-1356.

Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E. and Di Virgilio, F. (2006). "The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release." J Immunol 176(7): 3877-3883.

Ferrari, D., Wesselborg, S., Bauer, M. K. and Schulze-Osthoff, K. (1997). "Extracellular ATP activates transcription factor NF-kappaB through the P2Z purinoreceptor by selectively targeting NF-kappaB p65." J Cell Biol 139(7): 1635-1643.

Fields, R. D. and Burnstock, G. (2006). "Purinergic signalling in neuron-glia interactions." Nat Rev Neurosci 7(6): 423-436.

Flores, R. V., Hernandez-Perez, M. G., Aquino, E., Garrad, R. C., Weisman, G. A. and Gonzalez, F. A. (2005). "Agonist-induced phosphorylation and desensitization of the P2Y2 nucleotide receptor." Mol Cell Biochem 280(1-2): 35-45.

Fredholm, B. B., AP, I. J., Jacobson, K. A., Klotz, K. N. and Linden, J. (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors." Pharmacol Rev 53(4): 527-552.

Fumagalli, M., Brambilla, R., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Verderio, C. and Abbracchio, M. P. (2003). "Nucleotide-mediated calcium signaling in rat cortical astrocytes: Role of P2X and P2Y receptors." Glia 43(3): 218-203.

Fumagalli, M., Trincavelli, L., Lecca, D., Martini, C., Ciana, P. and Abbracchio, M. P. (2004). "Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor." Biochem Pharmacol 68(1): 113-124.

Gachet, C. (2006). "Regulation of platelet functions by P2 receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol 46: 277-300.

- Ganesh, S., Puri, R., Singh, S., Mittal, S. and Dubey, D.** (2006). "Recent advances in the molecular basis of Lafora's progressive myoclonus epilepsy." *J Hum Genet* **51**(1): 1-8.
- Gao, Z. G., Ding, Y. and Jacobson, K. A.** (2010). "P2Y(13) receptor is responsible for ADP-mediated degranulation in RBL-2H3 rat mast cells." *Pharmacol Res* **62**(6): 500-505.
- Garcia-Huerta, P., Diaz-Hernandez, M., Delicado, E. G., Pimentel-Santillana, M., Miras-Portugal, M. T. and Gomez-Villafuertes, R.** (2012). "The specificity protein factor Sp1 mediates transcriptional regulation of P2X7 receptors in the nervous system." *J Biol Chem* **287**(53): 44628-44644.
- Garcia, A., Shankar, H., Murugappan, S., Kim, S. and Kunapuli, S. P.** (2007). "Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets." *Biochem J* **404**(2): 299-308.
- Geetha, N., Mihaly, J., Stockenhuber, A., Blasi, F., Uhrin, P., Binder, B. R., Freissmuth, M. and Breuss, J. M.** (2011). "Signal integration and coincidence detection in the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (ERK) cascade: concomitant activation of receptor tyrosine kinases and of LRP-1 leads to sustained ERK phosphorylation via down-regulation of dual specificity phosphatases (DUSP1 and -6)." *J Biol Chem* **286**(29): 25663-25674.
- Gendron, F. P., Neary, J. T., Theiss, P. M., Sun, G. Y., Gonzalez, F. A. and Weisman, G. A.** (2003). "Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(2): C571-581.
- Gever, J. R., Cockayne, D. A., Dillon, M. P., Burnstock, G. and Ford, A. P.** (2006). "Pharmacology of P2X channels." *Pflugers Arch* **452**(5): 513-537.
- Ghosh, S., Spagnoli, G. C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M. and Reschner, A.** (2005). "Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study." *J Cell Physiol* **204**(2): 522-531.
- Givant-Horwitz, V., Davidson, B., Goderstad, J. M., Nesland, J. M., Trope, C. G. and Reich, R.** (2004). "The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma." *Gynecol Oncol* **93**(2): 517-523.
- Goding, J. W., Grobбен, B. and Slegers, H.** (2003). "Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family." *Biochim Biophys Acta* **1638**(1): 1-19.
- Gomez-Villafuertes, R., del Puerto, A., Diaz-Hernandez, M., Bustillo, D., Diaz-Hernandez, J. I., Huerta, P. G., Artalejo, A. R., Garrido, J. J. and Miras-Portugal, M. T.** (2009). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates



- P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells." FEBS J **276**(18): 5307-5325.
- Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T.** (2001). "Single GABAergic synaptic terminals from rat midbrain exhibit functional P2X and dinucleotide receptors, able to induce GABA secretion." J Neurochem **77**(1): 84-93.
- Gomez-Villafuertes, R., Pintor, J., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T.** (2003). "GABAB receptor-mediated presynaptic potentiation of ATP ionotropic receptors in rat midbrain synaptosomes." Neuropharmacology **44**(3): 311-323.
- Gomez-Villafuertes, R., Pintor, J., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T.** (2004). "GABA modulates presynaptic signalling mediated by dinucleotides on rat synaptic terminals." J Pharmacol Exp Ther **308**(3): 1148-1157.
- Gonnord, P., Delarasse, C., Auger, R., Benihoud, K., Prigent, M., Cuif, M. H., Lamaze, C. and Kanellopoulos, J. M.** (2009). "Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts." FASEB J **23**(3): 795-805.
- Gonzales, E. B., Kawate, T. and Gouaux, E.** (2009). "Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors." Nature **460**(7255): 599-604.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C. and Perez, J. M.** (2001). "Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis?" Mol Pharmacol **59**(4): 657-663.
- Gordon, J. L.** (1986). "Extracellular ATP: effects, sources and fate." Biochem J **233**(2): 309-319.
- Gozdz, A., Habas, A., Jaworski, J., Zielinska, M., Albrecht, J., Chlystun, M., Jalili, A. and Hetman, M.** (2003). "Role of N-methyl-D-aspartate receptors in the neuroprotective activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 by cisplatin." J Biol Chem **278**(44): 43663-43671.
- Gozdz, A., Vashishta, A., Kalita, K., Szatmari, E., Zheng, J. J., Tamiya, S., Delamere, N. A. and Hetman, M.** (2008). "Cisplatin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase." J Biol Chem **283**(12): 8045-8053.
- Groom, L. A., Sneddon, A. A., Alessi, D. R., Dowd, S. and Keyse, S. M.** (1996). "Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase." EMBO J **15**(14): 3621-3632.
- Grumont, R. J., Rasko, J. E., Strasser, A. and Gerondakis, S.** (1996). "Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway induces transcription of the PAC-1 phosphatase gene." Mol Cell Biol **16**(6): 2913-2921.
- Gu, B. J., Rathsam, C., Stokes, L., McGeachie, A. B. and Wiley, J. S.** (2009). "Extracellular ATP dissociates nonmuscle myosin from P2X(7) complex: this dissociation regulates P2X(7) pore formation." Am J Physiol Cell Physiol **297**(2): C430-439.

- Gu, B. J., Sluyter, R., Skarratt, K. K., Shemon, A. N., Dao-Ung, L. P., Fuller, S. J., Barden, J. A., Clarke, A. L., Petrou, S. and Wiley, J. S. (2004). "An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X7 receptor." *J Biol Chem* **279**(30): 31287-31295.
- Gu, B. J., Zhang, W., Worthington, R. A., Sluyter, R., Dao-Ung, P., Petrou, S., Barden, J. A. and Wiley, J. S. (2001). "A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor." *J Biol Chem* **276**(14): 11135-11142.
- Gualix, J., Fideu, M. D., Pintor, J., Rotllan, P., Garcia-Carmona, F. and Miras-Portugal, M. T. (1997). "Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla." *FASEB J* **11**(12): 981-990.
- Gualix, J., Gomez-Villafuertes, R., Diaz-Hernandez, M. and Miras-Portugal, M. T. (2003). "Presence of functional ATP and dinucleotide receptors in glutamatergic synaptic terminals from rat midbrain." *J Neurochem* **87**(1): 160-171.
- Gualix, J., Pintor, J. and Miras-Portugal, M. T. (1999). "Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles." *J Neurochem* **73**(3): 1098-1104.
- Gum, R. J., Gaede, L. L., Heindel, M. A., Waring, J. F., Trevillyan, J. M., Zinker, B. A., Stark, M. E., Wilcox, D., Jirousek, M. R., Rondinone, C. M. and Ulrich, R. G. (2003). "Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice." *Mol Endocrinol* **17**(6): 1131-1143.
- Guo, C., Masin, M., Qureshi, O. S. and Murrell-Lagnado, R. D. (2007). "Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors." *Mol Pharmacol* **72**(6): 1447-1456.
- Hammer, M., Mages, J., Dietrich, H., Schmitz, F., Striebel, F., Murray, P. J., Wagner, H. and Lang, R. (2005). "Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10." *Eur J Immunol* **35**(10): 2991-3001.
- Hammer, M., Mages, J., Dietrich, H., Servatius, A., Howells, N., Cato, A. C. and Lang, R. (2006). "Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock." *J Exp Med* **203**(1): 15-20.
- Harkness, D. R. (1968). "Studies on human placental alkaline phosphatase. II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme." *Arch Biochem Biophys* **126**(2): 513-523.
- Harper, S. J. and LoGrasso, P. (2001). "Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38." *Cell Signal* **13**(5): 299-310.
- Hashimoto, M., Sagara, Y., Langford, D., Everall, I. P., Mallory, M., Everson, A., Digicaylioglu, M. and Masliah, E. (2002). "Fibroblast growth factor 1 regulates



- signaling via the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  pathway. Implications for neuroprotection." *J Biol Chem* **277**(36): 32985-32991.
- Hattori, M. and Gouaux, E. (2012). "Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors." *Nature* **485**(7397): 207-212.
- He, Y. Y., Huang, J. L. and Chignell, C. F. (2004). "Delayed and sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in human keratinocytes by UVA: implications in carcinogenesis." *J Biol Chem* **279**(51): 53867-53874.
- Herbert, M. R., Russo, J. P., Yang, S., Roohi, J., Blaxill, M., Kahler, S. G., Cremer, L. and Hatchwell, E. (2006). "Autism and environmental genomics." *Neurotoxicology* **27**(5): 671-684.
- Herlaar, E. and Brown, Z. (1999). "p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease." *Mol Med Today* **5**(10): 439-447.
- Hervas, C., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2003). "Coexpression of functional P2X and P2Y nucleotide receptors in single cerebellar granule cells." *J Neurosci Res* **73**(3): 384-399.
- Hervas, C., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2005). "Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals." *Biochem Pharmacol* **70**(5): 770-785.
- Hetman, M. and Gozdz, A. (2004). "Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival." *Eur J Biochem* **271**(11): 2050-2055.
- Hetman, M., Vashishta, A. and Rempala, G. "Neurotoxic mechanisms of DNA damage: focus on transcriptional inhibition." *J Neurochem* **114**(6): 1537-1549.
- Hoffmann, C., Moro, S., Nicholas, R. A., Harden, T. K. and Jacobson, K. A. (1999). "The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y<sub>1</sub> receptor in surface expression and activation processes." *J Biol Chem* **274**(21): 14639-14647.
- Hoffmann, K., Sixel, U., Di Pasquale, F. and von Kugelgen, I. (2008). "Involvement of basic amino acid residues in transmembrane regions 6 and 7 in agonist and antagonist recognition of the human platelet P2Y<sub>12</sub>-receptor." *Biochem Pharmacol* **76**(10): 1201-1213.
- Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. and Conley, P. B. (2001). "Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs." *Nature* **409**(6817): 202-207.
- Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M. T., Hsieh, G., Zhu, C. Z., Mikusa, J. P.,

- Hernandez, G., Zhong, C., Gauvin, D. M., Chandran, P., Harris, R., Medrano, A. P., Carroll, W., Marsh, K., Sullivan, J. P., Faltynek, C. R. and Jarvis, M. F. (2006). "A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat." *J Pharmacol Exp Ther* **319**(3): 1376-1385.
- Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-i, S., Wada, H., Fujimoto, J. and Kohno, M. (1999). "Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors." *Oncogene* **18**(3): 813-822.
- Housley, G. D., Luo, L. and Ryan, A. F. (1998). "Localization of mRNA encoding the P2X2 receptor subunit of the adenosine 5'-triphosphate-gated ion channel in the adult and developing rat inner ear by in situ hybridization." *J Comp Neurol* **393**(4): 403-414.
- Hoylaerts, M. F., Manes, T. and Millan, J. L. (1997). "Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes." *J Biol Chem* **272**(36): 22781-22787.
- Huang, C. Y. and Tan, T. H. (2012). "DUSPs, to MAP kinases and beyond." *Cell Biosci* **2**(1): 24.
- Humphreys, B. D. and Dubyak, G. R. (1996). "Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN-gamma in the human THP-1 monocytic cell line." *J Immunol* **157**(12): 5627-5637.
- Inbe, H., Watanabe, S., Miyawaki, M., Tanabe, E. and Encinas, J. A. (2004). "Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y15, for AMP and adenosine." *J Biol Chem* **279**(19): 19790-19799.
- Ito, M. (1984). "The cerebellum and neural control. New York: Raven."
- Ito, M. (2002). "The molecular organization of cerebellar long-term depression." *Nat Rev Neurosci* **3**(11): 896-902.
- Ivanov, A. A., Costanzi, S. and Jacobson, K. A. (2006). "Defining the nucleotide binding sites of P2Y receptors using rhodopsin-based homology modeling." *J Comput Aided Mol Des* **20**(7-8): 417-426.
- Jacobson, K. A., Costanzi, S., Ohno, M., Joshi, B. V., Besada, P., Xu, B. and Tchilibon, S. (2004). "Molecular recognition at purine and pyrimidine nucleotide (P2) receptors." *Curr Top Med Chem* **4**(8): 805-819.
- Jacobson, K. A., Jarvis, M. F. and Williams, M. (2002). "Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets." *J Med Chem* **45**(19): 4057-4093.

- Jahr, C. E. and Jessell, T. M. (1983). "ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones." Nature **304**(5928): 730-733.
- Janssens, V. and Goris, J. (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling." Biochem J **353**(Pt 3): 417-439.
- Janssens, V., Goris, J. and Van Hoof, C. (2005). "PP2A: the expected tumor suppressor." Curr Opin Genet Dev **15**(1): 34-41.
- Jantzen, H. M., Gousset, L., Bhaskar, V., Vincent, D., Tai, A., Reynolds, E. E. and Conley, P. B. (1999). "Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation." Thromb Haemost **81**(1): 111-117.
- Jeffrey, K. L., Brummer, T., Rolph, M. S., Liu, S. M., Callejas, N. A., Grumont, R. J., Gillieron, C., Mackay, F., Grey, S., Camps, M., Rommel, C., Gerondakis, S. D. and Mackay, C. R. (2006). "Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1." Nat Immunol **7**(3): 274-283.
- Ji, R. R., Samad, T. A., Jin, S. X., Schmoll, R. and Woolf, C. J. (2002). "p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia." Neuron **36**(1): 57-68.
- Jiang, L. H., Mackenzie, A. B., North, R. A. and Surprenant, A. (2000a). "Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors." Mol Pharmacol **58**(1): 82-88.
- Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A. and North, R. A. (2000b). "Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor." J Biol Chem **275**(44): 34190-34196.
- Jiang, Y., Li, Z., Schwarz, E. M., Lin, A., Guan, K., Ulevitch, R. J. and Han, J. (1997). "Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection." J Biol Chem **272**(17): 11096-11102.
- Jimenez, E., Zafra, F., Perez-Sen, R., Delicado, E. G., Miras-Portugal, M. T., Aragon, C. and Lopez-Corcuera, B. (2011). "P2Y purinergic regulation of the glycine neurotransmitter transporters." J Biol Chem **286**(12): 10712-10724.
- Jo, Y. H. and Role, L. W. (2002). "Cholinergic modulation of purinergic and GABAergic co-transmission at in vitro hypothalamic synapses." J Neurophysiol **88**(5): 2501-2508.
- Jo, Y. H. and Schlichter, R. (1999). "Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons." Nat Neurosci **2**(3): 241-245.

- Johnson, G. L. and Lapadat, R.** (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-1912.
- Joost, P. and Methner, A.** (2002). "Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands." *Genome Biol* **3**(11): RESEARCH0063.
- Junttila, M. R., Li, S. P. and Westermarck, J.** (2008). "Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival." *FASEB J* **22**(4): 954-965.
- Jurek, A., Amagasaki, K., Gembarska, A., Heldin, C. H. and Lennartsson, J.** (2009). "Negative and positive regulation of MAPK phosphatase 3 controls platelet-derived growth factor-induced Erk activation." *J Biol Chem* **284**(7): 4626-4634.
- Kahlenberg, J. M. and Dubyak, G. R.** (2004). "Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release." *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(5): C1100-1108.
- Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H. and Karin, M.** (2005). "Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases." *Cell* **120**(5): 649-661.
- Kang, M. R., Muller, M. T. and Chung, I. K.** (2004). "Telomeric DNA damage by topoisomerase I. A possible mechanism for cell killing by camptothecin." *J Biol Chem* **279**(13): 12535-12541.
- Karin, M. and Gallagher, E.** (2005). "From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance." *IUBMB Life* **57**(4-5): 283-295.
- Karlsson, M., Mathers, J., Dickinson, R. J., Mandl, M. and Keyse, S. M.** (2004). "Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal." *J Biol Chem* **279**(40): 41882-41891.
- Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T. and Gouaux, E.** (2009). "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state." *Nature* **460**(7255): 592-598.
- Keniry, M. and Parsons, R.** (2008). "The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy." *Oncogene* **27**(41): 5477-5485.
- Keyse, S. M.** (2008a). "Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer." *Cancer Metastasis Rev* **27**(2): 253-261.
- Keyse, S. M.** (2008b). "Protein phosphatases and cancer. Preface." *Cancer Metastasis Rev* **27**(2): 121-122.

- Keyse, S. M. and Ginsburg, M.** (1993). "Amino acid sequence similarity between CL100, a dual-specificity MAP kinase phosphatase and cdc25." *Trends Biochem Sci* 18(10): 377-378.
- Khakh, B. S., Burnstock, G., Kennedy, C., King, B. F., North, R. A., Seguela, P., Voigt, M. and Humphrey, P. P.** (2001). "International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits." *Pharmacol Rev* 53(1): 107-118.
- Khakh, B. S., Gittermann, D., Cockayne, D. A. and Jones, A.** (2003). "ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons." *J Neurosci* 23(19): 7426-7437.
- Khasabova, I. A., Khasabov, S., Paz, J., Harding-Rose, C., Simone, D. A. and Seybold, V. S.** (2012). "Cannabinoid type-1 receptor reduces pain and neurotoxicity produced by chemotherapy." *J Neurosci* 32(20): 7091-7101.
- Kim, M., Jiang, L. H., Wilson, H. L., North, R. A. and Surprenant, A.** (2001). "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex." *EMBO J* 20(22): 6347-6358.
- Kim, S. C., Hahn, J. S., Min, Y. H., Yoo, N. C., Ko, Y. W. and Lee, W. J.** (1999). "Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1." *Blood* 93(11): 3893-3899.
- Kim, Y. C., Lee, J. S., Sak, K., Marteau, F., Mamedova, L., Boeynaems, J. M. and Jacobson, K. A.** (2005). "Synthesis of pyridoxal phosphate derivatives with antagonist activity at the P2Y13 receptor." *Biochem Pharmacol* 70(2): 266-274.
- Kimbler, D. E., Shields, J., Yanasak, N., Vender, J. R. and Dhandapani, K. M.** (2012). "Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice." *PLoS One* 7(7): e41229.
- King, B. F. and Townsend-Nicholson, A.** (2008). "Involvement of P2Y1 and P2Y11 purinoceptors in parasympathetic inhibition of colonic smooth muscle." *J Pharmacol Exp Ther* 324(3): 1055-1063.
- King, B. F., Townsend-Nicholson, A., Wildman, S. S., Thomas, T., Spyer, K. M. and Burnstock, G.** (2000). "Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes." *J Neurosci* 20(13): 4871-4877.
- King, B. F. T.-N., A** (2003). "Nucleoside and nucleotide receptors." *Tocris Rev.* 23: 1-11.
- Kinney, C. M., Chandrasekharan, U. M., Yang, L., Shen, J., Kinter, M., McDermott, M. S. and DiCorleto, P. E.** (2009). "Histone H3 as a novel substrate for MAP kinase phosphatase-1." *Am J Physiol Cell Physiol* 296(2): C242-249.



- Kondoh, K. and Nishida, E. (2007). "Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases." Biochim Biophys Acta **1773**(8): 1227-1237.
- Koyama, T., Mikami, T., Koyama, T., Imakiire, A., Yamamoto, K., Toyota, H. and Mizuguchi, J. (2006). "Apoptosis induced by chemotherapeutic agents involves c-Jun N-terminal kinase activation in sarcoma cell lines." J Orthop Res **24**(6): 1153-1162.
- Krishtal, O. A., Marchenko, S. M. and Pidoplichko, V. I. (1983). "Receptor for ATP in the membrane of mammalian sensory neurones." Neurosci Lett **35**(1): 41-45.
- Kristiansen, M., Hughes, R., Patel, P., Jacques, T. S., Clark, A. R. and Ham, J. "Mkp1 is a c-Jun target gene that antagonizes JNK-dependent apoptosis in sympathetic neurons." J Neurosci **30**(32): 10820-10832.
- Kugelgen, v. (2006). "Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes." Pharmacol Ther **110**(3): 415-432.
- Kukulski, F., Levesque, S. A., Lavoie, E. G., Lecka, J., Bigonnesse, F., Knowles, A. F., Robson, S. C., Kirley, T. L. and Sevigny, J. (2005). "Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8." Purinergic Signal **1**(2): 193-204.
- Kukulski, F., Levesque, S. A. and Sevigny, J. (2011). "Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling." Adv Pharmacol **61**: 263-299.
- Lagerstrom, M. C. and Schioth, H. B. (2008). "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery." Nat Rev Drug Discov **7**(4): 339-357.
- Lambeth, J. D. (2004). "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." Nat Rev Immunol **4**(3): 181-189.
- Lazarowski, E. (2006). "Regulated release of nucleotides and UDP sugars from astrocytoma cells." Novartis Found Symp **276**: 73-84; discussion 84-90, 107-112, 275-181.
- Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. and Harden, T. K. (2003). "Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules." Mol Pharmacol **64**(4): 785-795.
- Le Feuvre, R., Brough, D. and Rothwell, N. (2002). "Extracellular ATP and P2X7 receptors in neurodegeneration." Eur J Pharmacol **447**(2-3): 261-269.
- Lecca, D., Trincavelli, M. L., Gelosa, P., Sironi, L., Ciana, P., Fumagalli, M., Villa, G., Verderio, C., Grumelli, C., Guerrini, U., Tremoli, E., Rosa, P., Cuboni, S., Martini, C., Buffo, A., Cimino, M. and Abbracchio, M. P. (2008). "The recently

- identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair." *PLoS One* **3**(10): e3579.
- Lechner, S. G. and Boehm, S.** (2004). "Regulation of neuronal ion channels via P2Y receptors." *Purinergic Signal* **1**(1): 31-41.
- Ledent, C., Vaugeois, J. M., Schiffmann, S. N., Pedrazzini, T., El Yacoubi, M., Vanderhaeghen, J. J., Costentin, J., Heath, J. K., Vassart, G. and Parmentier, M.** (1997). "Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor." *Nature* **388**(6643): 674-678.
- Lee, S. H., Park, J., Che, Y., Han, P. L. and Lee, J. K.** (2000). "Constitutive activity and differential localization of p38alpha and p38beta MAPKs in adult mouse brain." *J Neurosci Res* **60**(5): 623-631.
- Leon-Otegui, M., Gomez-Villafuertes, R., Diaz-Hernandez, J. I., Diaz-Hernandez, M., Miras-Portugal, M. T. and Gualix, J.** (2011). "Opposite effects of P2X7 and P2Y2 nucleotide receptors on alpha-secretase-dependent APP processing in Neuro-2a cells." *FEBS Lett* **585**(14): 2255-2262.
- Leon, D., Hervas, C. and Miras-Portugal, M. T.** (2006). "P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons." *Eur J Neurosci* **23**(11): 2999-3013.
- Leon, D., Marin-Garcia, P., Sanchez-Nogueiro, J., de la, O. F., Garcia-Carmona, F. and Miras-Portugal, M. T.** (2007). "P2X agonist BzATP interferes with amplex-red-coupled fluorescence assays." *Anal Biochem* **367**(1): 140-142.
- Leon, D., Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P. and Miras-Portugal, M. A.** (2008). "Glutamate release and synapsin-I phosphorylation induced by P2X7 receptors activation in cerebellar granule neurons." *Neurochem Int* **52**(6): 1148-1159.
- Levinthal, D. J. and Defranco, D. B.** (2005). "Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons." *J Biol Chem* **280**(7): 5875-5883.
- Levy-Nissenbaum, O., Sagi-Assif, O., Raanani, P., Avigdor, A., Ben-Bassat, I. and Witz, I. P.** (2003). "cDNA microarray analysis reveals an overexpression of the dual-specificity MAPK phosphatase PYST2 in acute leukemia." *Methods Enzymol* **366**: 103-113.
- Li, J., Gorospe, M., Hutter, D., Barnes, J., Keyse, S. M. and Liu, Y.** (2001). "Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation." *Mol Cell Biol* **21**(23): 8213-8224.
- Li, S. P., Junttila, M. R., Han, J., Kahari, V. M. and Westermarck, J.** (2003). "p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing



- dephosphorylation of mitogenLin, J. W., Sugimori, M., Llinas, R. R., McGuinness, T. L. and Greengard, P. (1990). "Effects of synapsin I and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on spontaneous neurotransmitter release in the squid giant synapse." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8257-8261.
- Lin, S. C., Chien, C. W., Lee, J. C., Yeh, Y. C., Hsu, K. F., Lai, Y. Y. and Tsai, S. J. "Suppression of dual-specificity phosphatase-2 by hypoxia increases chemoresistance and malignancy in human cancer cells." J Clin Invest **121**(5): 1905-1916.
- Lisbona, C., Alemany, S. and Fernandez-Renart, M. (1997). "Regulation of ERK2 dephosphorylation in G1-stimulated rat T lymphoblasts." J Clin Immunol **17**(6): 494-501.
- Liu, Q. and Hofmann, P. A. (2003). "Modulation of protein phosphatase 2a by adenosine A1 receptors in cardiomyocytes: role for p38 MAPK." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(1): H97-103.
- Liu, Y., Lagowski, J., Sundholm, A., Sundberg, A. and Kulesz-Martin, M. (2007). "Microtubule disruption and tumor suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4." Cancer Res **67**(22): 10711-10719.
- Loy, B., Apostolova, G., Dorn, R., McGuire, V. A., Arthur, J. S. and Dechant, G. (2011). "p38alpha and p38beta mitogen-activated protein kinases determine cholinergic transdifferentiation of sympathetic neurons." J Neurosci **31**(34): 12059-12067.
- Lucae, S., Salyakina, D., Barden, N., Harvey, M., Gagne, B., Labbe, M., Binder, E. B., Uhr, M., Paez-Pereda, M., Sillaber, I., Ising, M., Bruckl, T., Lieb, R., Holsboer, F. and Muller-Myhsok, B. (2006). "P2RX7, a gene coding for a purinergic ligand-gated ion channel, is associated with major depressive disorder." Hum Mol Genet **15**(16): 2438-2445.
- Lustig, K. D., Shiau, A. K., Brake, A. J. and Julius, D. (1993). "Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(11): 5113-5117.
- Lynch, K. J., Touma, E., Niforatos, W., Kage, K. L., Burgard, E. C., van Biesen, T., Kowaluk, E. A. and Jarvis, M. F. (1999). "Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors." Mol Pharmacol **56**(6): 1171-1181.
- Lyubchenko, T., Woodward, H., Veo, K. D., Burns, N., Nijmeh, H., Liubchenko, G. A., Stenmark, K. R. and Gerasimovskaya, E. V. (2011). "P2Y1 and P2Y13 purinergic receptors mediate Ca<sup>2+</sup> signaling and proliferative responses in pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **300**(2): C266-275.
- Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B. D., Ye, S. Q., Garcia, J. G. and Semenza, G. L. (2005). "Transcriptional regulation of vascular endothelial

- cell responses to hypoxia by HIF-1." *Blood* **105**(2): 659-669.
- Mandic, A., Viktorsson, K., Heiden, T., Hansson, J. and Shoshan, M. C.** (2001). "The MEK1 inhibitor PD98059 sensitizes C8161 melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis." *Melanoma Res* **11**(1): 11-19.
- Mansouri, A., Ridgway, L. D., Korapati, A. L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z. H., Mills, G. B. and Claret, F. X.** (2003). "Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells." *J Biol Chem* **278**(21): 19245-19256.
- Marchese, A., George, S. R., Kolakowski, L. F., Jr., Lynch, K. R. and O'Dowd, B. F.** (1999). "Novel GPCRs and their endogenous ligands: expanding the boundaries of physiology and pharmacology." *Trends Pharmacol Sci* **20**(9): 370-375.
- Marchetti, S., Gimond, C., Chambard, J. C., Touboul, T., Roux, D., Pouyssegur, J. and Pages, G.** (2005). "Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation." *Mol Cell Biol* **25**(2): 854-864.
- Marin-García, P.** (2007). Receptores de nucleótidos P2X presentes en Sistema Nervioso Central de Ratón: Caracterización y función. *Bioquímica y Biología Molecular IV*. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.
- Marin-Garcia, P., Sanchez-Nogueiro, J., Gomez-Villafuertes, R., Leon, D. and Miras-Portugal, M. T.** (2008). "Synaptic terminals from mice midbrain exhibit functional P2X7 receptor." *Neuroscience* **151**(2): 361-373.
- Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., Bhargava, Y., Eisele, T. and Nicke, A.** (2007). "Identification of an intersubunit cross-link between substituted cysteine residues located in the putative ATP binding site of the P2X1 receptor." *J Neurosci* **27**(6): 1456-1466.
- Marshall, C. J.** (1995). "Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation." *Cell* **80**(2): 179-185.
- Martinez, F. E., Crill, W. E. and Kennedy, T. T.** (1971). "Electrogenesis of cerebellar Purkinje cell responses in cats." *J Neurophysiol* **34**(3): 348-356.
- McQuillin, A., Bass, N. J., Choudhury, K., Puri, V., Kosmin, M., Lawrence, J., Curtis, D. and Gurling, H. M.** (2009). "Case-control studies show that a non-conservative amino-acid change from a glutamine to arginine in the P2RX7 purinergic receptor protein is associated with both bipolar- and unipolar-affective disorders." *Mol Psychiatry* **14**(6): 614-620.
- McWhinney, S. R., Goldberg, R. M. and McLeod, H. L.** (2009). "Platinum neurotoxicity pharmacogenetics." *Mol Cancer Ther* **8**(1): 10-16.

- Melani, A., Amadio, S., Gianfriddo, M., Vannucchi, M. G., Volonte, C., Bernardi, G., Pedata, F. and Sancesario, G. (2006). "P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat." *J Cereb Blood Flow Metab* **26**(7): 974-982.
- Meyer-Franke, A., Kaplan, M. R., Pfrieger, F. W. and Barres, B. A. (1995). "Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture." *Neuron* **15**(4): 805-819.
- Michel, A. D., Chambers, L. J., Clay, W. C., Condreay, J. P., Walter, D. S. and Chessell, I. P. (2007). "Direct labelling of the human P2X7 receptor and identification of positive and negative cooperativity of binding." *Br J Pharmacol* **151**(1): 103-114.
- Miki, A., Tanaka, Y., Ogata, S. and Ikehara, Y. (1986). "Selective preparation and characterization of membranous and soluble forms of alkaline phosphatase from rat tissues. A comparison with the serum enzyme." *Eur J Biochem* **160**(1): 41-48.
- Millan, J. L. (2006). "Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes." *Purinergic Signal* **2**(2): 335-341.
- Miras-Portugal, M. T., Diaz-Hernandez, M., Giraldez, L., Hervas, C., Gomez-Villafuertes, R., Sen, R. P., Gualix, J. and Pintor, J. (2003). "P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells." *Neurochem Res* **28**(10): 1597-1605.
- Monteiro, F. A., Sousa, M. M., Cardoso, I., do Amaral, J. B., Guimaraes, A. and Saraiva, M. J. (2006). "Activation of ERK1/2 MAP kinases in familial amyloidotic polyneuropathy." *J Neurochem* **97**(1): 151-161.
- Moore, D., Chambers, J., Waldvogel, H., Faull, R. and Emson, P. (2000). "Regional and cellular distribution of the P2Y(1) purinergic receptor in the human brain: striking neuronal localisation." *J Comp Neurol* **421**(3): 374-384.
- Moore, D. J., Chambers, J. K., Wahlin, J. P., Tan, K. B., Moore, G. B., Jenkins, O., Emson, P. C. and Murdock, P. R. (2001). "Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study." *Biochim Biophys Acta* **1521**(1-3): 107-119.
- Moro, S. and Jacobson, K. A. (2002). "Molecular modeling as a tool to investigate molecular recognition in P2Y receptors." *Curr Pharm Des* **8**(26): 2401-2413.
- Morooka, T. and Nishida, E. (1998). "Requirement of p38 mitogen-activated protein kinase for neuronal differentiation in PC12 cells." *J Biol Chem* **273**(38): 24285-24288.
- Muda, M., Boschert, U., Dickinson, R., Martinou, J. C., Martinou, I., Camps, M.,

- Schlegel, W. and Arkinstall, S. (1996). "MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase." *J Biol Chem* **271**(8): 4319-4326.
- Murphy, L. O. and Blenis, J. (2006). "MAPK signal specificity: the right place at the right time." *Trends Biochem Sci* **31**(5): 268-275.
- Muscella, A., Urso, L., Calabriso, N., Ciccarese, A., Migoni, D., Fanizzi, F. P., Di Jeso, B., Storelli, C. and Marsigliante, S. (2005). "Differential response of normal, dedifferentiated and transformed thyroid cell lines to cisplatin treatment." *Biochem Pharmacol* **71**(1-2): 50-60.
- Nagaya, N., Tittle, R. K., Saar, N., Dellal, S. S. and Hume, R. I. (2005). "An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors." *J Biol Chem* **280**(28): 25982-25993.
- Nelson, D. W., Gregg, R. J., Kort, M. E., Perez-Medrano, A., Voight, E. A., Wang, Y., Grayson, G., Namovic, M. T., Donnelly-Roberts, D. L., Niforatos, W., Honore, P., Jarvis, M. F., Faltynek, C. R. and Carroll, W. A. (2006). "Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists." *J Med Chem* **49**(12): 3659-3666.
- Nguyen, T., Erb, L., Weisman, G. A., Marchese, A., Heng, H. H., Garrad, R. C., George, S. R., Turner, J. T. and O'Dowd, B. F. (1995). "Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene." *J Biol Chem* **270**(52): 30845-30848.
- Nicke, A. (2008). "Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits." *Biochem Biophys Res Commun* **377**(3): 803-808.
- Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. and Schmalzing, G. (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." *EMBO J* **17**(11): 3016-3028.
- Nicke, A., Kuan, Y. H., Masin, M., Rettinger, J., Marquez-Klaka, B., Bender, O., Gorecki, D. C., Murrell-Lagnado, R. D. and Soto, F. (2009). "A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice." *J Biol Chem* **284**(38): 25813-25822.
- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." *Cell Death Differ* **6**(11): 1028-1042.
- Noguchi, K., Ishii, S. and Shimizu, T. (2003). "Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family." *J Biol Chem* **278**(28): 25600-25606.
- Norenberg, W. and Illes, P. (2000). "Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties." *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **362**(4-5): 324-339.

- North, R. A. (1996). "Families of ion channels with two hydrophobic segments." Curr Opin Cell Biol 8(4): 474-483.
- North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." Physiol Rev 82(4): 1013-1067.
- Nunes-Xavier, C. E., Tarrega, C., Cejudo-Marin, R., Frijhoff, J., Sandin, A., Ostman, A. and Pulido, R. (2010). "Differential up-regulation of MAP kinase phosphatases MKP3/DUSP6 and DUSP5 by Ets2 and c-Jun converge in the control of the growth arrest versus proliferation response of MCF-7 breast cancer cells to phorbol ester." J Biol Chem 285(34): 26417-26430.
- O'Dwyer, P. J., Stevenson, J. P. and Johnson, S. W. (2000). "Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs." Drugs 59 Suppl 4: 19-27.
- O'Halloran, C. J., Kinsella, G. J. and Storey, E. (2012). "The cerebellum and neuropsychological functioning: a critical review." J Clin Exp Neuropsychol 34(1): 35-56.
- Obersteiner, H. (1880). "Beitrage zur Kenntnis von feineren Bau der Kleinhirnrinde." Sitzungsb. Kais. Akad. Wissench(60): 101-114.
- Ogata, S., Hayashi, Y., Takami, N. and Ikehara, Y. (1988). "Chemical characterization of the membrane-anchoring domain of human placental alkaline phosphatase." J Biol Chem 263(21): 10489-10494.
- Okudela, K., Yazawa, T., Woo, T., Sakaeda, M., Ishii, J., Mitsui, H., Shimoyamada, H., Sato, H., Tajiri, M., Ogawa, N., Masuda, M., Takahashi, T., Sugimura, H. and Kitamura, H. (2009). "Down-regulation of DUSP6 expression in lung cancer: its mechanism and potential role in carcinogenesis." Am J Pathol 175(2): 867-881.
- Olah, M. E. and Stiles, G. L. (2000). "The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity." Pharmacol Ther 85(2): 55-75.
- Orriss, I. R., Burnstock, G. and Arnett, T. R. (2010). "Purinergic signalling and bone remodelling." Curr Opin Pharmacol 10(3): 322-330.
- Ortega, F., Perez-Sen, R., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2009). "P2X7 nucleotide receptor is coupled to GSK-3 inhibition and neuroprotection in cerebellar granule neurons." Neurotox Res 15(3): 193-204.
- Ortega, F., Perez-Sen, R., Delicado, E. G. and Teresa Miras-Portugal, M. (2011). "ERK1/2 activation is involved in the neuroprotective action of P2Y13 and P2X7 receptors against glutamate excitotoxicity in cerebellar granule neurons." Neuropharmacology 61(8): 1210-1221.



- Ortega, F., Perez-Sen, R. and Miras-Portugal, M. T. (2008). "Gi-coupled P2Y-ADP receptor mediates GSK-3 phosphorylation and beta-catenin nuclear translocation in granule neurons." *J Neurochem* **104**(1): 62-73.
- Ortega, F., Perez-Sen, R., Morente, V., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (2010). "P2X7, NMDA and BDNF receptors converge on GSK3 phosphorylation and cooperate to promote survival in cerebellar granule neurons." *Cell Mol Life Sci*.
- Otero, M., Garrad, R. C., Velazquez, B., Hernandez-Perez, M. G., Camden, J. M., Erb, L., Clarke, L. L., Turner, J. T., Weisman, G. A. and Gonzalez, F. A. (2000). "Mechanisms of agonist-dependent and -independent desensitization of a recombinant P2Y2 nucleotide receptor." *Mol Cell Biochem* **205**(1-2): 115-123.
- Owens, D. M. and Keyse, S. M. (2007). "Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases." *Oncogene* **26**(22): 3203-3213.
- Pankratov, Y., Castro, E., Miras-Portugal, M. T. and Krishtal, O. (1998). "A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus." *Eur J Neurosci* **10**(12): 3898-3902.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhratsky, A. and North, R. A. (2006). "Vesicular release of ATP at central synapses." *Pflugers Arch* **452**(5): 589-597.
- Papp, L., Vizi, E. S. and Sperlagh, B. (2007). "P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus." *Biochem Biophys Res Commun* **355**(2): 568-574.
- Parr, C. E., Sullivan, D. M., Paradiso, A. M., Lazarowski, E. R., Burch, L. H., Olsen, J. C., Erb, L., Weisman, G. A., Boucher, R. C. and Turner, J. T. (1994). "Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8): 3275-3279.
- Patterson, K. I., Brummer, T., O'Brien, P. M. and Daly, R. J. (2009). "Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets." *Biochem J* **418**(3): 475-489.
- Paul, S., Nairn, A. C., Wang, P. and Lombroso, P. J. (2003). "NMDA-mediated activation of the tyrosine phosphatase STEP regulates the duration of ERK signaling." *Nat Neurosci* **6**(1): 34-42.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M. H. (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." *Endocr Rev* **22**(2): 153-183.
- Peng, W., Cotrina, M. L., Han, X., Yu, H., Bekar, L., Blum, L., Takano, T., Tian, G. F., Goldman, S. A. and Nedergaard, M. (2009). "Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal

- cord injury." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(30): 12489-12493.
- Perez Lopez, I., Cariolato, L., Maric, D., Gillet, L., Abriel, H. and Diviani, D.** (2013). "AKAP-LBC COORDINATES A p38 ACTIVATING SIGNALING COMPLEX CONTROLLING COMPENSATORY CARDIAC HYPERTROPHY." Mol Cell Biol.
- Pintor, J., Porras, A., Mora, F. and Miras-Portugal, M. T.** (1993). "Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from caudate putamen of conscious rat." Neurosci Lett **150**(1): 13-16.
- Pintor, J., Porras, A., Mora, F. and Miras-Portugal, M. T.** (1995). "Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate and diadenosine pentaphosphate, from neostriatum of the conscious rat." J Neurochem **64**(2): 670-676.
- Pintor, J., Rotllan, P., Torres, M. and Miras-Portugal, M. T.** (1992). "Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release." Anal Biochem **200**(2): 296-300.
- Pintor, J., Torres, M. and Miras-Portugal, M. T.** (1991). "Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells." Life Sci **48**(24): 2317-2324.
- Pintor, J. K., H.J.; Torres, M.; Miras-Portugal, M.T.; Zimmermann, H.** (1992). "Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the *Torpedo* electric organ." Neurosci. Res. Commun. **10**: 9-15.
- Poddar, R., Deb, I., Mukherjee, S. and Paul, S.** (2010). "NR2B-NMDA receptor mediated modulation of the tyrosine phosphatase STEP regulates glutamate induced neuronal cell death." J Neurochem **115**(6): 1350-1362.
- Podratz, J. L., Knight, A. M., Ta, L. E., Staff, N. P., Gass, J. M., Genelin, K., Schlattau, A., Lathroum, L. and Windebank, A. J.** (2011). "Cisplatin induced mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons." Neurobiol Dis **41**(3): 661-668.
- Pons, S., Trejo, J. L., Martinez-Morales, J. R. and Marti, E.** (2001). "Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation." Development **128**(9): 1481-1492.
- Potucek, Y. D., Crain, J. M. and Watters, J. J.** (2006). "Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression." Neurochem Int **49**(2): 204-214.
- Prestayko, A. W., D'Aoust, J. C., Issell, B. F. and Crooke, S. T.** (1979). "Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II)." Cancer Treat Rev **6**(1): 17-39.



- Prickett, T. D. and Brautigan, D. L.** (2007). "Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3." Mol Cell Biol 27(12): 4217-4227.
- Rakhade, S. N., Yao, B., Ahmed, S., Asano, E., Beaumont, T. L., Shah, A. K., Draghici, S., Krauss, R., Chugani, H. T., Sood, S. and Loeb, J. A.** (2005). "A common pattern of persistent gene activation in human neocortical epileptic foci." Ann Neurol 58(5): 736-747.
- Ramon y Cajal, S.** (1911 ). "Histology du system nerveux de l'homme et vertebres, Vol 2. Paris: Malonine." Histology du system nerveux de l'homme et vertebres, Vol 2. Paris: Malonine.
- Ramon y Cajal, S.** (1960). "Studies on vertebrate neurogenesis." Springfield: Thomas.
- Ramos, J. W.** (2008). "The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells." Int J Biochem Cell Biol 40(12): 2707-2719.
- Reffas, S. and Schlegel, W.** (2000). "Compartment-specific regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) by ERK-dependent and non-ERK-dependent inductions of MAPK phosphatase (MKP)-3 and MKP-1 in differentiating P19 cells." Biochem J 352 Pt 3: 701-708.
- Rettinger, J. and Schmalzing, G.** (2003). "Activation and desensitization of the recombinant P2X1 receptor at nanomolar ATP concentrations." J Gen Physiol 121(5): 451-461.
- Richardson, P. J. and Brown, S. J.** (1987). "ATP release from affinity-purified rat cholinergic nerve terminals." J Neurochem 48(2): 622-630.
- Roberts, J. A. and Evans, R. J.** (2004). "ATP binding at human P2X1 receptors. Contribution of aromatic and basic amino acids revealed using mutagenesis and partial agonists." J Biol Chem 279(10): 9043-9055.
- Roberts, J. A. and Evans, R. J.** (2006). "Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP." J Neurochem 96(3): 843-852.
- Roberts, J. A., Vial, C., Digby, H. R., Agboh, K. C., Wen, H., Atterbury-Thomas, A. and Evans, R. J.** (2006). "Molecular properties of P2X receptors." Pflugers Arch 452(5): 486-500.
- Robertson, G., Bilenky, M., Lin, K., He, A., Yuen, W., Dagpinar, M., Varhol, R., Teague, K., Griffith, O. L., Zhang, X., Pan, Y., Hassel, M., Sleumer, M. C., Pan, W., Pleasance, E. D., Chuang, M., Hao, H., Li, Y. Y., Robertson, N., Fjell, C., Li,**

- B., Montgomery, S. B., Astakhova, T., Zhou, J., Sander, J., Siddiqui, A. S. and Jones, S. J. (2006). "cisRED: a database system for genome-scale comRobson, S. C., Sevigny, J. and Zimmermann, H. (2006). "The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance." *Purinergic Signal* 2(2): 409-430.
- Rodriguez del Castillo, A., Torres, M., Delicado, E. G. and Miras-Portugal, M. T. (1988). "Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates--Ap4A and Ap5A--in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules." *J Neurochem* 51(6): 1696-1703.
- Roger, S., Mei, Z. Z., Baldwin, J. M., Dong, L., Bradley, H., Baldwin, S. A., Surprenant, A. and Jiang, L. H. (2010). "Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions." *J Psychiatr Res* 44(6): 347-355.
- Roger, S., Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2008). "Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding." *J Neurosci* 28(25): 6393-6401.
- Rogers, T. D., McKimm, E., Dickson, P. E., Goldowitz, D., Blaha, C. D. and Mittleman, G. (2013). "Is autism a disease of the cerebellum? An integration of clinical and pre-clinical research." *Front Syst Neurosci* 7: 15.
- Rohan, P. J., Davis, P., Moskaluk, C. A., Kearns, M., Krutzsch, H., Siebenlist, U. and Kelly, K. (1993). "PAC-1: a mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase." *Science* 259(5102): 1763-1766.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Schwartzentruber, D. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Topalian, S. L., Seipp, C. A., Einhorn, J. H., White, D. E. and Steinberg, S. M. (1999). "Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b." *J Clin Oncol* 17(3): 968-975.
- Rossig, L., Haendeler, J., Hermann, C., Malchow, P., Urbich, C., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2000). "Nitric oxide down-regulates MKP-3 mRNA levels: involvement in endothelial cell protection from apoptosis." *J Biol Chem* 275(33): 25502-25507.
- Roux, P. P. and Blenis, J. (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 320-344.
- Ryser, S., Massiha, A., Piuz, I. and Schlegel, W. (2004). "Stimulated initiation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) gene transcription involves the synergistic action of multiple cis-acting elements in the proximal promoter." *Biochem J* 378(Pt 2): 473-484.

- Salojin, K. V., Owusu, I. B., Millerchip, K. A., Potter, M., Platt, K. A. and Oravec, T.** (2006). "Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses." *J Immunol* **176**(3): 1899-1907.
- Salter, M. W., De Koninck, Y. and Henry, J. L.** (1993). "Physiological roles for adenosine and ATP in synaptic transmission in the spinal dorsal horn." *Prog Neurobiol* **41**(2): 125-156.
- Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P., Leon, D., Leon-Otegui, M., Salas, E., Gomez-Villafuertes, R., Gualix, J. and Miras-Portugal, M. T.** (2009). "Axodendritic fibres of mouse cerebellar granule neurons exhibit a diversity of functional P2X receptors." *Neurochem Int* **55**(7): 671-682.
- Sanchez-Nogueiro, J., Marin-Garcia, P. and Miras-Portugal, M. T.** (2005). "Characterization of a functional P2X(7)-like receptor in cerebellar granule neurons from P2X(7) knockout mice." *FEBS Lett* **579**(17): 3783-3788.
- Sanchez, I., Hughes, R. T., Mayer, B. J., Yee, K., Woodgett, J. R., Avruch, J., Kyriakis, J. M. and Zon, L. I.** (1994). "Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun." *Nature* **372**(6508): 794-798.
- Sarkozi, R., Miller, B., Pollack, V., Feifel, E., Mayer, G., Sorokin, A. and Schramek, H.** (2007). "ERK1/2-driven and MKP-mediated inhibition of EGF-induced ERK5 signaling in human proximal tubular cells." *J Cell Physiol* **211**(1): 88-100.
- Savi, P. and Herbert, J. M.** (2005). "Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis." *Semin Thromb Hemost* **31**(2): 174-183.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y.** (2008). "Identification of a vesicular nucleotide transporter." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(15): 5683-5686.
- Sawynok, J., Downie, J. W., Reid, A. R., Cahill, C. M. and White, T. D.** (1993). "ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin." *Brain Res* **610**(1): 32-38.
- Saxena, M. and Mustelin, T.** (2000). "Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase." *Semin Immunol* **12**(4): 387-396.
- Saxena, M., Williams, S., Tasken, K. and Mustelin, T.** (1999). "Crosstalk between cAMP-dependent kinase and MAP kinase through a protein tyrosine phosphatase." *Nat Cell Biol* **1**(5): 305-311.
- Scuteri, A., Galimberti, A., Maggioni, D., Ravasi, M., Pasini, S., Nicolini, G., Bossi, M., Miloso, M., Cavaletti, G. and Tredici, G.** (2009). "Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis." *Neurotoxicology* **30**(2): 312-319.

- Schachter, J. B., Li, Q., Boyer, J. L., Nicholas, R. A. and Harden, T. K. (1996). "Second messenger cascade specificity and pharmacological selectivity of the human P2Y1-purinoceptor." Br J Pharmacol **118**(1): 167-173.
- Schmahmann, J. D. (2004). "Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **16**(3): 367-378.
- Schmahmann, J. D. and Pandya, D. N. (1997). "The cerebrocerebellar system." Int Rev Neurobiol **41**: 31-60.
- Schoneberg, T., Schulz, A., Grosse, R., Schade, R., Henklein, P., Schultz, G. and Gudermann, T. (1999). "A novel subgroup of class I G-protein-coupled receptors." Biochim Biophys Acta **1446**(1-2): 57-70.
- Schulze-Lohoff, E., Hugo, C., Rost, S., Arnold, S., Gruber, A., Brune, B. and Sterzel, R. B. (1998). "Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors." Am J Physiol **275**(6 Pt 2): F962-971.
- Shaver, S. R. (2001). "P2Y receptors: biological advances and therapeutic opportunities." Curr Opin Drug Discov Devel **4**(5): 665-670.
- Shemon, A. N., Sluyter, R., Fernando, S. L., Clarke, A. L., Dao-Ung, L. P., Skarratt, K. K., Saunders, B. M., Tan, K. S., Gu, B. J., Fuller, S. J., Britton, W. J., Petrou, S. and Wiley, J. S. (2006). "A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages." J Biol Chem **281**(4): 2079-2086.
- Shi, Z., Resing, K. A. and Ahn, N. G. (2006). "Networks for the allosteric control of protein kinases." Curr Opin Struct Biol **16**(6): 686-692.
- Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ishida, S., Sawada, J., Ohno, Y. and Inoue, K. (2005). "Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors." Glia **49**(2): 288-300.
- Shinozaki, Y., Koizumi, S., Ohno, Y., Nagao, T. and Inoue, K. (2006). "Extracellular ATP counteracts the ERK1/2-mediated death-promoting signaling cascades in astrocytes." Glia **54**(6): 606-618.
- Simon, J., Kidd, E. J., Smith, F. M., Chessell, I. P., Murrell-Lagnado, R., Humphrey, P. P. and Barnard, E. A. (1997). "Localization and functional expression of splice variants of the P2X2 receptor." Mol Pharmacol **52**(2): 237-248.
- Sneddon, P., Westfall, T. D., Todorov, L. D., Todorova, S. M., Westfall, D. P., Nickel, P. and Kennedy, C. (2000). "The effect of P2 receptor antagonists and ATPase inhibition on sympathetic purinergic neurotransmission in the guinea-pig

- isolated vas deferens." Br J Pharmacol **129**(6): 1089-1094.
- Snigdha, S., Smith, E. D., Prieto, G. A. and Cotman, C. W.** (2012). "Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death." Neurosci Bull **28**(1): 14-24.
- Sokolova, E., Skorinkin, A., Fabbretti, E., Masten, L., Nistri, A. and Giniatullin, R.** (2004). "Agonist-dependence of recovery from desensitization of P2X(3) receptors provides a novel and sensitive approach for their rapid up or downregulation." Br J Pharmacol **141**(6): 1048-1058.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., Griffiths, R. J. and Gabel, C. A.** (2001). "Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors." J Biol Chem **276**(1): 125-132.
- Sontag, E., Fedorov, S., Kamibayashi, C., Robbins, D., Cobb, M. and Mumby, M.** (1993). "The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation." Cell **75**(5): 887-897.
- Sotelo, C.** (2011). "Camillo Golgi and Santiago Ramon y Cajal: the anatomical organization of the cortex of the cerebellum. Can the neuron doctrine still support our actual knowledge on the cerebellar structural arrangement?" Brain Res Rev **66**(1-2): 16-34.
- Sperlagh, B., Csölle, C., Ando, R. D., Goloncser, F., Kittel, A. and Baranyi, M.** (2012). "The role of purinergic signaling in depressive disorders." Neuropsychopharmacol Hung **14**(4): 231-238.
- Sperlagh, B., Heinrich, A. and Csölle, C.** (2007). "P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release-an update." Purinergic Signal **3**(4): 269-284.
- Sperlagh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K. and Illes, P.** (2006). "P2X7 receptors in the nervous system." Prog Neurobiol **78**(6): 327-346.
- Stanciu, M. and DeFranco, D. B.** (2002). "Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated protein kinase promotes cell death generated by oxidative toxicity or proteasome inhibition in a neuronal cell line." J Biol Chem **277**(6): 4010-4017.
- Stanciu, M., Wang, Y., Kentor, R., Burke, N., Watkins, S., Kress, G., Reynolds, I., Klann, E., Angiolieri, M. R., Johnson, J. W. and DeFranco, D. B.** (2000). "Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures." J Biol Chem **275**(16): 12200-12206.
- Staples, C. J., Owens, D. M., Maier, J. V., Cato, A. C. and Keyse, S. M.** "Cross-talk



between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation." J Biol Chem 285(34): 25928-25940.

**Stefan, C., Jansen, S. and Bollen, M.** (2005). "NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity." Trends Biochem Sci 30(10): 542-550.

**Stefano, L., Rossler, O. G., Griesemer, D., Hoth, M. and Thiel, G.** (2007). "P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca(2+) rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1." J Cell Physiol 213(1): 36-44.

**Stewart, A. E., Dowd, S., Keyse, S. M. and McDonald, N. Q.** (1999). "Crystal structure of the MAPK phosphatase Pyst1 catalytic domain and implications for regulated activation." Nat Struct Biol 6(2): 174-181.

**Stokes, L., Fuller, S. J., Sluyter, R., Skarratt, K. K., Gu, B. J. and Wiley, J. S.** (2010). "Two haplotypes of the P2X7 receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1{beta} secretion." FASEB J.

**Subramaniam, S., Shahani, N., Strelau, J., Laliberte, C., Brandt, R., Kaplan, D. and Unsicker, K.** (2005). "Insulin-like growth factor 1 inhibits extracellular signal-regulated kinase to promote neuronal survival via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase A/c-Raf pathway." J Neurosci 25(11): 2838-2852.

**Subramaniam, S., Strelau, J. and Unsicker, K.** (2003). "Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways." J Biol Chem 278(11): 8904-8912.

**Subramaniam, S. and Unsicker, K.** (2010). "ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death." FEBS J 277(1): 22-29.

**Subramaniam, S., Zirrgiebel, U., von Bohlen Und Halbach, O., Strelau, J., Laliberte, C., Kaplan, D. R. and Unsicker, K.** (2004). "ERK activation promotes neuronal degeneration predominantly through plasma membrane damage and independently of caspase-3." J Cell Biol 165(3): 357-369.

**Sultan, F. and Glickstein, M.** (2007). "The cerebellum: Comparative and animal studies." Cerebellum 6(3): 168-176.

**Sun, D., Samuelson, L. C., Yang, T., Huang, Y., Paliege, A., Saunders, T., Briggs, J. and Schnermann, J.** (2001). "Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A 98(17): 9983-9988.

- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A. and Buell, G.** (1996). "The cytolitic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." Science **272**(5262): 735-738.
- Tabata, K., Baba, K., Shiraishi, A., Ito, M. and Fujita, N.** (2007). "The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor." Biochem Biophys Res Commun **363**(3): 861-866.
- Takeda, K. and Ichijo, H.** (2002). "Neuronal p38 MAPK signalling: an emerging regulator of cell fate and function in the nervous system." Genes Cells **7**(11): 1099-1111.
- Takeshita, S., Toda, M. and Yamagishi, H.** (1989). "Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus." EMBO J **8**(11): 3261-3270.
- Tamura, M., Sebastian, S., Yang, S., Gurates, B., Ferrer, K., Sasano, H., Okamura, K. and Bulun, S. E.** (2002). "Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin synthesis in endometrial stromal cells by malignant endometrial epithelial cells. A paracrine effect mediated by prostaglandin E2 and nuclear factor-kappa B." J Biol Chem **277**(29): 26208-26216.
- Tanaka, N., Kamanaka, M., Enslen, H., Dong, C., Wysk, M., Davis, R. J. and Flavell, R. A.** (2002). "Differential involvement of p38 mitogen-activated protein kinase kinases MKK3 and MKK6 in T-cell apoptosis." EMBO Rep **3**(8): 785-791.
- Tanzola, M. B. and Kersh, G. J.** (2006). "The dual specificity phosphatase transcriptome of the murine thymus." Mol Immunol **43**(6): 754-762.
- Tivey, H. S., Rokicki, M. J., Barnacle, J. R., Rogers, M. J., Bagley, M. C., Kipling, D. and Davis, T.** (2013). "Small Molecule Inhibition of p38 MAP Kinase Extends the Replicative Life Span of Human ATR-Seckel Syndrome Fibroblasts." J Gerontol A Biol Sci Med Sci.
- Todd, J. L., Tanner, K. G. and Denu, J. M.** (1999). "Extracellular regulated kinases (ERK) 1 and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR. A novel role in down-regulating the ERK pathway." J Biol Chem **274**(19): 13271-13280.
- Todorov, L. D., Mihaylova-Todorova, S., Westfall, T. D., Sneddon, P., Kennedy, C., Bjur, R. A. and Westfall, D. P.** (1997). "Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation." Nature **387**(6628): 76-79.
- Tokuyama, Y., Hara, M., Jones, E. M., Fan, Z. and Bell, G. I.** (1995). "Cloning of rat and mouse P2Y purinoceptors." Biochem Biophys Res Commun **211**(1): 211-218.
- Toledano-Katchalski, H., Kraut, J., Sines, T., Granot-Attas, S., Shohat, G., Gil-Henn, H., Yung, Y. and Elson, A.** (2003). "Protein tyrosine phosphatase epsilon inhibits



- signaling by mitogen-activated protein kinases." Mol Cancer Res **1**(7): 541-550.
- Tonks, N. K.** (2005). "Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling." Cell **121**(5): 667-670.
- Torres, G. E., Egan, T. M. and Voigt, M. M.** (1999). "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners." J Biol Chem **274**(10): 6653-6659.
- Toth-Zsamboki, E., Oury, C., Watanabe, H., Nilius, B., Vermynen, J. and Hoylaerts, M. F.** (2002). "The intracellular tyrosine residues of the ATP-gated P2X(1) ion channel are essential for its function." FEBS Lett **524**(1-3): 15-19.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A. and Davis, R. J.** (2000). "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway." Science **288**(5467): 870-874.
- Tsujita, E., Taketomi, A., Gion, T., Kuroda, Y., Endo, K., Watanabe, A., Nakashima, H., Aishima, S., Kohnoe, S. and Maehara, Y.** (2005). "Suppressed MKP-1 is an independent predictor of outcome in patients with hepatocellular carcinoma." Oncology **69**(4): 342-347.
- Uday Bhanu, M. and Kondapi, A. K.** (2010). "Neurotoxic activity of a topoisomerase-I inhibitor, camptothecin, in cultured cerebellar granule neurons." Neurotoxicology **31**(6): 730-737.
- Vacca, F., Amadio, S., Sancesario, G., Bernardi, G. and Volonte, C.** (2004). "P2X3 receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells." J Neurosci Res **76**(5): 653-661.
- Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C., Bergmann, J. E. and Gaitanaris, G. A.** (2003). "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4903-4908.
- Vaudry, D., Stork, P. J., Lazarovici, P. and Eiden, L. E.** (2002). "Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections." Science **296**(5573): 1648-1649.
- Venditto, V. J. and Simanek, E. E.** (2010). "Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature." Mol Pharm **7**(2): 307-349.
- Verhoef, P. A., Estacion, M., Schilling, W. and Dubyak, G. R.** (2003). "P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release." J Immunol **170**(11): 5728-5738.

- Vial, C. and Evans, R. J. (2005). "Disruption of lipid rafts inhibits P2X1 receptor-mediated currents and arterial vasoconstriction." *J Biol Chem* **280**(35): 30705-30711.
- Vial, C., Roberts, J. A. and Evans, R. J. (2004). "Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels." *Trends Pharmacol Sci* **25**(9): 487-493.
- Villedieu, M., Deslandes, E., Duval, M., Heron, J. F., Gauduchon, P. and Poulain, L. (2006). "Acquisition of chemoresistance following discontinuous exposures to cisplatin is associated in ovarian carcinoma cells with progressive alteration of FAK, ERK and p38 activation in response to treatment." *Gynecol Oncol* **101**(3): 507-519.
- Virginio, C., Church, D., North, R. A. and Surprenant, A. (1997). "Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor." *Neuropharmacology* **36**(9): 1285-1294.
- Volonte, C. and D'Ambrosi, N. (2009). "Membrane compartments and purinergic signalling: the purinome, a complex interplay among ligands, degrading enzymes, receptors and transporters." *FEBS J* **276**(2): 318-329.
- Vollmayer, P., Clair, T., Goding, J. W., Sano, K., Servos, J. and Zimmermann, H. (2003). "Hydrolysis of diadenosine polyphosphates by nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases." *Eur J Biochem* **270**(14): 2971-2978.
- von Kugelgen, I. (2006). "Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes." *Pharmacol Ther* **110**(3): 415-432.
- von Kugelgen, I. and Harden, T. K. (2011). "Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors." *Adv Pharmacol* **61**: 373-415.
- von Kugelgen, I. and Starke, K. (1991). "Release of noradrenaline and ATP by electrical stimulation and nicotine in guinea-pig vas deferens." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **344**(4): 419-429.
- Waha, A., Felsberg, J., Hartmann, W., von dem Knesebeck, A., Mikeska, T., Joos, S., Wolter, M., Koch, A., Yan, P. S., Endl, E., Wiestler, O. D., Reifenberger, G., Pietsch, T. and Waha, A. (2010). "Epigenetic downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-2 relieves its growth suppressive activity in glioma cells." *Cancer Res* **70**(4): 1689-1699.
- Wall, M. E., Wani, M. C., Nicholas, A. W., Manikumar, G., Tele, C., Moore, L., Truesdale, A., Leitner, P. and Besterman, J. M. (1993). "Plant antitumor agents. 30. Synthesis and structure activity of novel camptothecin analogs." *J Med Chem* **36**(18): 2689-2700.
- Wang, L., Olivecrona, G., Gotberg, M., Olsson, M. L., Winzell, M. S. and Erlinge, D. (2005). "ADP acting on P2Y13 receptors is a negative feedback pathway for ATP

- release from human red blood cells." *Circ Res* **96**(2): 189-196.
- Wang, N., Rumney, R. M., Yang, L., Robaye, B., Boeynaems, J. M., Skerry, T. M. and Gartland, A.** (2013). "The P2Y<sub>13</sub> receptor regulates extracellular ATP metabolism." *Cell Res* **23**(12): 1999-2009.
- Wang, X. and Jiang, X.** (2008). "PTEN: a default gate-keeping tumor suppressor with a versatile tail." *Cell Res* **18**(8): 807-816.
- Ward, M. M., Leach, T. J. and Weisman, M. H.** "Cervical vertebral squaring in patients without spondyloarthritis." *J Rheumatol* **39**(9): 1900.
- Webb, T. E., Henderson, D., King, B. F., Wang, S., Simon, J., Bateson, A. N., Burnstock, G. and Barnard, E. A.** (1996). "A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y<sub>3</sub>) activated preferentially by nucleoside diphosphates." *Mol Pharmacol* **50**(2): 258-265.
- Webb, T. E., Simon, J., Krishek, B. J., Bateson, A. N., Smart, T. G., King, B. F., Burnstock, G. and Barnard, E. A.** (1993). "Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor." *FEBS Lett* **324**(2): 219-225.
- Wei, W., Jiao, Y., Postlethwaite, A., Stuart, J. M., Wang, Y., Sun, D. and Gu, W.** (2013). "Dual-specificity phosphatases 2: surprising positive effect at the molecular level and a potential biomarker of diseases." *Genes Immun* **14**(1): 1-6.
- Weisman, G. A., Wang, M., Kong, Q., Chorna, N. E., Neary, J. T., Sun, G. Y., Gonzalez, F. A., Seye, C. I. and Erb, L.** (2005). "Molecular determinants of P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes." *Mol Neurobiol* **31**(1-3): 169-183.
- Westermarck, J., Holmstrom, T., Ahonen, M., Eriksson, J. E. and Kahari, V. M.** (1998). "Enhancement of fibroblast collagenase-1 (MMP-1) gene expression by tumor promoter okadaic acid is mediated by stress-activated protein kinases Jun N-terminal kinase and p38." *Matrix Biol* **17**(8-9): 547-557.
- Westermarck, J., Li, S. P., Kallunki, T., Han, J. and Kahari, V. M.** (2001). "p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of protein phosphatases 1 and 2A inhibits MEK1 and MEK2 activity and collagenase 1 (MMP-1) gene expression." *Mol Cell Biol* **21**(7): 2373-2383.
- Wick, A., Wick, W., Hirrlinger, J., Gerhardt, E., Dringen, R., Dichgans, J., Weller, M. and Schulz, J. B.** (2004). "Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: in vitro paradigm of differential neurotoxicity." *J Neurochem* **91**(5): 1067-1074.
- Wiessner, C.** (1995). "The dual specificity phosphatase PAC-1 is transcriptionally induced in the rat brain following transient forebrain ischemia." *Brain Res Mol Brain Res* **28**(2): 353-356.

- Wildman, S. S., Brown, S. G., Rahman, M., Noel, C. A., Churchill, L., Burnstock, G., Unwin, R. J. and King, B. F. (2002). "Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1)." Mol Pharmacol **62**(4): 957-966.
- Wiley, J. S., Dao-Ung, L. P., Li, C., Shemon, A. N., Gu, B. J., Smart, M. L., Fuller, S. J., Barden, J. A., Petrou, S. and Sluyter, R. (2003). "An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor." J Biol Chem **278**(19): 17108-17113.
- Witting, A., Chen, L., Cudaback, E., Straiker, A., Walter, L., Rickman, B., Moller, T., Brosnan, C. and Stella, N. (2006). "Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6362-6367.
- Witting, A., Walter, L., Wacker, J., Moller, T. and Stella, N. (2004). "P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3214-3219.
- Wood, C. D., Thornton, T. M., Sabio, G., Davis, R. A. and Rincon, M. (2009). "Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage." Int J Biol Sci **5**(5): 428-437.
- Wu, M. H., Lin, S. C., Hsiao, K. Y. and Tsai, S. J. "Hypoxia-inhibited dual-specificity phosphatase-2 expression in endometriotic cells regulates cyclooxygenase-2 expression." J Pathol **225**(3): 390-400.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J. and Greenberg, M. E. (1995). "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis." Science **270**(5240): 1326-1331.
- Xu, S., Furukawa, T., Kanai, N., Sunamura, M. and Horii, A. (2005). "Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer." J Hum Genet **50**(4): 159-167.
- Yaar, R., Jones, M. R., Chen, J. F. and Ravid, K. (2005). "Animal models for the study of adenosine receptor function." J Cell Physiol **202**(1): 9-20.
- Yamagishi, S., Matsumoto, T., Yokomaku, D., Hatanaka, H., Shimoke, K., Yamada, M. and Ikeuchi, T. (2003). "Comparison of inhibitory effects of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor on low potassium-induced apoptosis and activation of p38 MAPK and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons." Brain Res Mol Brain Res **119**(2): 184-191.
- Yano, S., Tsukimoto, M., Harada, H. and Kojima, S. (2012). "Involvement of P2Y13 receptor in suppression of neuronal differentiation." Neurosci Lett **518**(1): 5-9.

- Yin, Y., Liu, Y. X., Jin, Y. J., Hall, E. J. and Barrett, J. C. (2003). "PAC1 phosphatase is a transcription target of p53 in signalling apoptosis and growth suppression." Nature **422**(6931): 527-531.
- Yin, Y. and Shen, W. H. (2008). "PTEN: a new guardian of the genome." Oncogene **27**(41): 5443-5453.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y. and Shimizu, T. (1997). "A G-protein-coupled receptor for leukotriene B<sub>4</sub> that mediates chemotaxis." Nature **387**(6633): 620-624.
- Yoshioka, K. and Nakata, H. (2004). "ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: purinergic receptor complex: generating adenosine nucleotide-sensitive adenosine receptors." J Pharmacol Sci **94**(2): 88-94.
- Yoshioka, K., Saitoh, O. and Nakata, H. (2002). "Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A(1) and P2Y(1) receptors in living cells." FEBS Lett **523**(1-3): 147-151.
- Young, M. T., Pelegri, P. and Surprenant, A. (2007). "Amino acid residues in the P2X<sub>7</sub> receptor that mediate differential sensitivity to ATP and BzATP." Mol Pharmacol **71**(1): 92-100.
- Yu, Y., Ugawa, S., Ueda, T., Ishida, Y., Inoue, K., Kyaw Nyunt, A., Umemura, A., Mase, M., Yamada, K. and Shimada, S. (2008). "Cellular localization of P2X<sub>7</sub> receptor mRNA in the rat brain." Brain Res **1194**: 45-55.
- Zebisch, A., Czernilofsky, A. P., Keri, G., Smigelskaite, J., Sill, H. and Troppmair, J. (2007). "Signaling through RAS-RAF-MEK-ERK: from basics to bedside." Curr Med Chem **14**(5): 601-623.
- Zeliadt, N. A., Mauro, L. J. and Wattenberg, E. V. (2008). "Reciprocal regulation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and mitogen activated protein kinase phosphatase-3." Toxicol Appl Pharmacol **232**(3): 408-417.
- Zhang, Q., Muller, M., Chen, C. H., Zeng, L., Farooq, A. and Zhou, M. M. (2005). "New insights into the catalytic activation of the MAPK phosphatase PAC-1 induced by its substrate MAPK ERK2 binding." J Mol Biol **354**(4): 777-788.
- Zhang, S. Q., Yang, W., Kontaridis, M. I., Bivona, T. G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J. A., Schraven, B. L., Philips, M. R. and Neel, B. G. (2004a). "Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment." Mol Cell **13**(3): 341-355.
- Zhang, Y., Blattman, J. N., Kennedy, N. J., Duong, J., Nguyen, T., Wang, Y., Davis, R. J., Greenberg, P. D., Flavell, R. A. and Dong, C. (2004b). "Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5." Nature **430**(7001):

793-797.

- Zhang, Y., Parsanejad, M., Huang, E., Qu, D., Aleyasin, H., Rousseaux, M. W., Gonzalez, Y. R., Cregan, S. P., Slack, R. S. and Park, D. S.** (2010). "Pim-1 kinase as activator of the cell cycle pathway in neuronal death induced by DNA damage." J Neurochem **112**(2): 497-510.
- Zhou, B., Zhang, J., Liu, S., Reddy, S., Wang, F. and Zhang, Z. Y.** (2006). "Mapping ERK2-MKP3 binding interfaces by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry." J Biol Chem **281**(50): 38834-38844.
- Zimmermann, H.** (1996). "Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system." Prog Neurobiol **49**(6): 589-618.
- Zimmermann, H.** (2000). "Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 299-309.
- Zimmermann, H., Mishra, S. K., Shukla, V., Langer, D., Gampe, K., Grimm, I., Delic, J. and Braun, N.** (2007). "Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact." An. r. Acad. Nac. Farm. **73** (2): 1-30.

